



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Simplificação do processo de multiplicação *in vitro* da oliveira “*Olea europaea* L.”

Augusto Viriato Almeida Palminha Ribeiro

Orientador: Professor Augusto António Vieira Peixe

Mestrado em Olivicultura e Azeite

Dissertação

Évora, 2016

* Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

“O sucesso é a consequência ”

Albert Einstein

Agradecimentos

Em primeiro lugar, ao Professor Augusto Peixe, do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, por ter aceitado orientar este trabalho, pelo apoio e permanente disponibilidade durante a fase experimental e de escrita, pois sem ele não teria sido possível a sua realização.

A Virgínia Sobral, do Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora, por todos os ensinamentos e total disponibilidade no decorrer de todo o trabalho.

Ao meu colega Hugo Ribeiro pela colaboração durante a realização do trabalho.

A Rita Pires, pela paciência e dedicação em todos os momentos.

Aos meus pais e família por todo o apoio que sempre me deram.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Resumo

A oliveira tem sido multiplicada ao longo dos tempos por métodos convencionais de propagação vegetativa como a enxertia e a estacaria lenhosa e semilenhosa. No entanto, estes métodos revelam-se lentos ou ineficientes para determinadas cultivares. No caso da cv. 'Galega Vulgar', ainda com grande expressão no olival português, e de difícil enraizamento por estacaria semilenhosa, tem sido usada a micropropagação de modo a contornar essas limitações e assim obter um elevado número de plantas em curto período de tempo. O custo final de produção por este processo ainda é elevado, podendo comprometer a sua aplicação a nível comercial. Grande parte dos custos estão relacionados com a fase de enraizamento *in vitro* que carece de ambiente estéril e condições de assépsia para a sua execução. Com vista a uma redução de custos associados a esta fase de produção, pretendeu-se com este trabalho testar a viabilidade do enraizamento *ex vitro*, na ausência de condições de assépsia. Este método poderá permitir uma significativa redução da mão-de-obra, ao mesmo tempo que facilitará a aclimatização das plantas e a obtenção de um sistema radicular de melhor qualidade. Compararam-se as taxas de enraizamento *in vitro* (controlo), com as obtidas *ex vitro*. Foram utilizados explantes provenientes de dois clones da cv. 'Galega Vulgar', (cl. 1441 e cl. 2022) cultivados e mantidos *in vitro* há vários anos no Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia da Universidade de Évora. Para além do clone foi avaliada a influência do tipo de estaca (basal e apical), da hormona de enraizamento (AIB e ANA), da sua concentração (540 e 3000 ppm) e ainda de dois substratos, Preformas Jiffy® e pastilhas de fibra coco. Os melhores resultados foram obtidos com o clone 1441 em pastilhas de fibra de coco prensada, com o uso de estacas basais. Quanto à auxina, não se observaram diferenças significativas entre a utilização de ANA na concentração de 540 ppm e AIB na concentração de 3000 ppm. A aclimatização das plantas foi conseguida com taxas elevadas de sucesso, independentemente do tratamento utilizado. Conclui-se que a aplicação do método de enraizamento *ex vitro* simplifica procedimentos e mantém taxas de enraizamento elevadas, conduzindo assim a uma efetiva redução de tempo e custos associados.

Simplifying procedures for in vitro propagation of olive “Olea europaea L.”

Abstract

The olive tree has been multiplied throughout the ages by conventional methods of vegetative propagation such as grafting and wood or softwood cuttings. These propagation methods are somehow inefficient for certain cultivars. For the CV. ‘Galega Vulgar’, still with great expression in Portuguese olive orchards, propagation has been attempted by *in vitro* culture in order to circumvent these limitations and so obtain a large number of plants in short time period. The final production fees associated to this process are still high which may compromise its application to a commercial level. Most of this process fees are related to the *in vitro* rooting phase which lacks sterile and aseptic conditions for its implementation. Aiming to reduce the costs associated with this production phase, this work tested the feasibility of the ex vitro rooting in the absence of aseptic conditions, which can allow a significant reduction of the manpower involved and an easier plant acclimatization due to its transplant with a balled-root system. *In vitro* rooting rates (control) were compared with those obtained with the ex vitro experiments. Explants from two clones of the cv. ‘Galega Vulgar’ (cl. 1441 and cl. 2022), grown and maintained *in vitro* for several years in the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding of the University of Évora, were used in the trials. In addition to the clone, the effect of the cutting type (basal and apical), the rooting hormone (AIB and ANA), their concentration (540 and 3000 ppm) and two substrates, Preformas Jiffy[®] and pressed coco fiber pellets, were also evaluated. The best results were obtained with the clone 1441, when rooted in pressed coco fiber pellets, using basal cuttings. Under this conditions no significant differences were observed between the use of ANA at 540 ppm or AIB in the 3000 ppm. Acclimatization of plants was achieved with high rates of success, regardless of the treatment used. It can be concluded that the application of the ex vitro rooting method allows to maintain high rooting rates, contributing for an effective reduction of time and fees of the rooting process.

Índice

Resumo.....	vi
Abstract	vii
Índice	viii
Lista de abreviaturas	10
Lista de Figuras	12
Lista de Tabelas	14
1. Introdução e objetivos	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1 Origem, classificação e características gerais da <i>Olea Europaea</i>	3
2.2. Descrição da variedade em estudo	5
2.3. Técnicas de propagação em <i>Olea Europaea</i>	8
2.3.1. Propagação por via seminal	8
2.3.2. Propagação por enxertia	8
2.3.2.1. Enxertia de gomo	10
2.3.2.2. Enxertia de garfo	10
2.3.3. Propagação por Estacaria	10
2.3.3.1. Formação de raízes adventícias em oliveira – descrição do processo e suas condicionantes	10
2.3.3.2. Estacaria lenhosa	14
2.3.3.3. Estacaria semilenhosa	15
2.3.4. Óvulos	17
2.3.5. Micropropagação	17
2.3.5.1. Descrição geral	17
2.3.5.2. Fases do processo de micropropagação em oliveira	19
2.3.5.2.1. Escolha do explante inicial e colocação em cultura asséptica	19
2.3.5.2.2. Fase de Multiplicação	21
2.3.5.2.3. Fase de Enraizamento	22
2.3.5.2.4. Fase de Aclimatização	23
2.4. Enraizamento <i>ex vitro</i> a partir de explantes produzidos <i>in vitro</i>	24
3. Material e Métodos	26
3.1. Materiais	26

3.1.1. Material Vegetal	26
3.1.2. Meios de Cultura	27
3.1.3. Substratos/contentores de enraizamento e aclimatização	28
3.1.4. Outros Materiais	30
3.2. Métodos	31
3.2.1. Preparação do material vegetal	31
3.2.2. Esterilização e desinfecção de materiais	32
3.2.3. Tratamentos para indução radical	33
3.2.4. Preparação dos meios de cultura <i>in vitro</i>	33
3.2.4.1. Preparação das soluções mãe	33
3.2.5. Condições de Cultura	37
3.3. Delineamento experimental e análise de dados.....	38
4. Resultados	40
5. Discussão.....	50
6. Conclusões	53
7. Referências Bibliográficas	56

Lista de abreviaturas

% – Percentagem

< - Menor

> - Maior

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

4-Cl-AIA – Ácido 4-cloro-indole-3-acético

a.C. – Antes de Cristo

AIA - Ácido indole-3-acético

AIB - Ácido indole-3-butírico

ANA - Ácido 1-naftalenoacético

BAP - 6-Benzilaminopurina

cm – Centímetros

CO₂ – Dióxido de Carbono

cv. – Cultivar

Dicamba - Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico

DOP – Denominação de Origem Protegida

Ex - Exemplo

FC-UL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Fe-EDTA - Quelato de Ferro EDTA

g L⁻¹ – Gramas por litro

h - Horas

IAAox – IAA oxidase

INE – Instituto Nacional de Estatística

ITQB – Instituto de Tecnologia Química e Biológica

LSD – Diferença Mínima Significativa (Teste de Fisher)

ml – Mililitros

mm – Milímetros

MS – Murashige e skoog Medium

°C – Graus Celsius

OM – Olive Medium

PAA - Ácido fenilacético

Picloram - 4-amino-3,5, ácido 6-tricloropicolínico

PPFD - Densidade de fluxo de fotões fotossintéticos

ppm – Partes por milhão

PPM - Plant Preservative Mixture

μM – Micromolar

Lista de Figuras

Figura 1- (A) Aspetto dos frutos e folhas na árvore da cv. 'Galega vulgar', (B) Pormenor das folhas, frutos e sementes da mesma cultivar.

Figura 2 – Segmentos caulinares normalmente utilizados em estacaria semilenhosa.

Figura 3 – Segmentos uninodais normalmente utilizados para iniciação em cultura asséptica.

Figura 4 – Aspetto das 'Preformas' Jiffy®.

Figura 5 – Aspetto das pastilhas de fibra de coco pensada antes de hidratadas.

Figura 6 – Tabuleiro alveolado com substrato de aclimatização e jovens plantas após enraizamento.

Figura 7 – Caixas utilizadas no processo de enraizamento *ex vitro*.

Figura 8 – Frascos utilizados no processo de cultura *in vitro*.

Figura 9 – Tabuleiros utilizados na fase de aclimatização.

Figura 10 – Estufins utilizados na fase da aclimatização.

Figura 11 – Aspectos da evolução dos explantes até atingirem o desenvolvimento necessário para se iniciar a fase de enraizamento.

Figura 12 – Contaminações de Fungos e Bactérias.

Figura 13 – Correlação entre a taxa de enraizamento e a taxa de contaminação.

Figura 14 - Variação do enraizamento em função do clone. (LSD 95%).

Figura 15 - Variação do enraizamento em função do tipo de estaca. (LSD 95%).

Figura 16 - Variação do enraizamento em função do substrato. (LSD 95%).

Figura 17 Comportamento do enraizamento para a interação clone*substrato. (LSD95%).

Figura 18 Comportamento do enraizamento para a interação tipo de estaca*substrato. (LSD95%).

Figura 19 - Taxas de enraizamento observadas em função da interação tripla entre as variáveis clone*tipo de estaca*substrato. (LSD 95%).

Figura 20 - Taxas de enraizamento observadas para a interação clone*concentração de auxina. (LSD 95%).

Figura 21 Comportamento do enraizamento no caso da interação tripla clone*auxina*concentração de auxina. (LSD 95%).

Figura 22 - Variação do enraizamento para a interação tripla substrato*auxina*concentração de auxina. (LSD 95%).

Figura 23 - Aspeto das plantas em aclimatização. (A) Início da aclimatização, plantas em estufim. (B) Plantas 20 dias após o início do processo de aclimatização, já sem estufim e prontas para passar para a estufa.

Figura 24 – Fluxograma de Produção.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Caracterização Molecular da cv. ‘Galega Vulgar’.

Tabela 2 – Parâmetros agronômicos relativos aos dois clones em estudo.

Tabela 3 – Composição base do meio de cultura OM.

Tabela 4 - Taxa de contaminação e enraizamento observadas no ensaio de enraizamento *in vitro*.

Tabela 5 – Valores da análise de variância apresentando todos os casos em que se observaram diferenças significativas para $p \leq 0,05$.

Tabela 6 – Valores médios das taxas de aclimatização conseguidas em cada um dos tratamentos efetuados no ensaio de enraizamento *in vitro* e *ex vitro*.

1. Introdução e objetivos

Portugal apresenta-se vulnerável às alterações climáticas, nomeadamente à seca e à desertificação (Santos *et al.*, 2006). Os cenários futuros indicam para o final do século XXI, para todas as regiões do país, um aumento significativo da temperatura média do ar, especialmente nos meses de Verão e nas regiões mais afastadas da influência marítima, prevendo a maioria dos modelos uma redução da precipitação e do número de dias em que ocorre (Silva, 2008). Ao verificar-se este cenário, a aposta em culturas que melhor se adaptem a ambientes áridos e secos, como é o caso da oliveira (Garcia, 1997), será certamente uma boa opção.

A oliveira é uma das culturas mais antigas na região mediterrânea e tem sido ao longo da sua existência multiplicada vegetativamente através de métodos convencionais como a estacaria lenhosa e semi-lenhosa e a enxertia. Estes métodos têm apresentado alguns problemas, uns por serem demasiado lentos e outros pouco eficientes, para algumas cultivares. Por exemplo, para a cv. 'Galega vulgar', abordada no presente trabalho, a sua propagação pelo método de estacaria semilenhosa sob nebulização apresenta baixas percentagens de enraizamento, o que inviabiliza a utilização do processo a nível comercial. De modo a contornar estas limitações e com vista a um aumento do número de plantas de alta qualidade produzidas com genótipos valiosos e uma diminuição do tempo do processo, a propagação *in vitro* tem sido usada como alternativa a esses métodos.

A capacidade de propagação *in vitro* da oliveira (*Olea europaea* L.) depende de muitos fatores internos e externos, como a genética do material vegetal utilizado, aspetos fisiológicos relacionados com a idade e fase de desenvolvimento da planta mãe, ou ambientais como a luz e temperatura e a composição nutritiva do meio de cultura (Mencuccini, 2002). De um modo geral, nos trabalhos de propagação *in vitro* da oliveira realizados até ao momento, o enraizamento carece de ambiente estéril e morosos cuidados de assépsia, de modo a evitar contaminações do meio e dos explantes por fungos e bactérias. Para além disso, quando não se recorre à técnica de indução do enraizamento por imersão do explante numa solução concentrada de reguladores de

crescimento '*pulse*', o processo exige a manipulação em dois meios de cultura, um para indução e outro para o enraizamento efetivo, aumentando significativamente os custos de produção.

Tem-se verificado que, mesmo cumpridos os cuidados de assépsia, as taxas de contaminação passam facilmente os 50%, e, apesar da percentagem de enraizamento de explantes não contaminados poder atingir 90-95%, as plantas obtidas quando o enraizamento ocorre *in vitro* podem apresentar maior dificuldade na aclimatização, visto serem transplantadas de raiz nua e sujeitas a grandes diferenças entre o meio de enraizamento *in vitro* (gelificado e estéril) e o substrato de aclimatização (orgânico ou inorgânico e não esterilizado).

De acordo com o que foi referido anteriormente e tendo por base o protocolo desenvolvido por Peixe *et al.* (2007) para a multiplicação *in vitro* da cultivar de oliveira 'Galega Vulgar', pretende-se com este trabalho simplificar a fase de enraizamento das plantas. Realizar-se-á o enraizamento *ex vitro*, a partir de explantes obtidos *in vitro*, recorrendo à técnica de indução radical, '*pulse*' e passagem direta dos explantes para substratos orgânicos, Preformas® jiffy e pastilhas de fibra de coco prensada. Com este método pretendem-se evitar os morosos cuidados de assépsia, o ambiente esterilizado e repetidas manipulações na fase do enraizamento, prevendo-se ainda uma melhor aclimatização das plantas enraizadas, devido a estarem sujeitas a um menor stress pois o transplante é realizado com raiz protegida. Pretende-se ainda durante a realização e decorrer do ensaio, estudar o comportamento dos clones quando sujeitos a tratamentos com diferentes auxinas, concentrações, e diferentes tipos de estaca, e acompanhar o desenvolvimento *in vitro*, o transplante após enraizamento e a sua adaptação à aclimatização.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Origem, classificação e características gerais da *Olea Europaea*

A *Olea Europaea* é a única espécie da família *Oleaceae* com fruto comestível. A sua origem data de 4000 – 3000 anos a.C. na Palestina sendo uma das mais antigas espécies cultivadas (Rodrigues & Correia, 2009). A espécie inclui muitos grupos e mais de 2600 cultivares, muitos dos quais podem ser ecótipos. A *Olea europaea* não parece ser uma espécie verdadeira, mas um grupo de formas derivado de hibridação e mutação (Therios, 2009).

A ordem *Lamiales*, à qual pertence, é constituída só por uma família botânica, (*Oleaceae*) mas inclui diferentes espécies distribuídas pelas regiões temperadas e tropicais do Mundo. O género *Olea*, dos 29 existentes nesta família que compreende 30 a 35 espécies é um dos mais importantes segundo uma perspetiva económica. A espécie *Olea europaea* pode ainda ser dividida em 2 subespécies. As oliveiras cultivadas pertencem à subespécie *sativa* e as oliveiras silvestres pertencem à subespécie *sylvestris* (Rodrigues & Correia, 2009).

Classificação Taxonómica de acordo com Therios (2009).

Reino: Plantas verdes

Sub-reino: *Tracheobionata*

Superdivisão: *Spermatophyta*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Subclasse: *Asteridae*

Ordem: *Scrophulariales* ou *Lamiales*

Família: *Oleaceae*

Género: *Olea*

Espécie: *Olea europaea* L.

Em relação ao seu cultivo, continua a ser predominante na região mediterrânica e Norte de África onde se encontram 95% dos olivais plantados, verificando-se um aumento da sua distribuição para outras regiões do globo como por exemplo: América do Sul, Austrália, Estados Unidos da América e China (Therios, 2009).

Em termos de área ocupada, segundo o INE (2011), é uma das principais culturas permanentes em Portugal, com uma área total de 335841 hectares, ocupando 52% da superfície total ocupada por culturas permanentes, (excluindo o pinheiro manso). As principais regiões em que é cultivado são as regiões do Alentejo com uma área correspondente a 49% da área total de olival, Trás-os-Montes com 22% e a Beira interior com 14%.

A oliveira é caracterizada por um ciclo de produção bianual, ou seja, os crescimentos do ano só produzem fruto no ano seguinte. O crescimento dos rebentos dá-se em simultâneo com floração e desenvolvimento do fruto. Em anos com forte vingamento de frutos as reservas são canalizadas para o seu desenvolvimento e para o crescimento vegetativo, levando a menores crescimentos de ramos do ano, comprometendo assim a produção no ano seguinte, estando na origem da conhecida safra e contrassafra que caracteriza a espécie.

É uma espécie particularmente adaptada a situações de climas com verão quente e seco, adaptação essa que resulta por um lado de características morfológicas próprias e mecanismos fisiológicos de adaptação que lhe permitem sobreviver em condições extremas. De entre estas destaca-se o seu sistema radicular que está bastante adaptado a precipitações escassas ou intermitentes das zonas mediterrâneas e a folha típica de plantas adaptadas a climas secos e quentes. Em termos de adaptação fisiológica a oliveira pode fechar os seus estomas à medida que a água vai escasseando no solo, podendo até deixar cair seus frutos e algumas folhas em casos de défice hídrico extremo. As raízes mais profundas podem extrair água em profundidade e redistribuí-las por outras raízes mais próximas da superfície. O controlo estomático influencia os crescimentos da árvore visto se os estomas estão fechados haverá menor entrada de CO₂, logo menos síntese de compostos orgânicos. A quantidade de água disponível para a planta influencia o número de frutos por árvore logo irá influenciar as produções por hectare (Fernández, 2013).

2.2. Descrição da variedade em estudo

A variedade ‘Galega vulgar’, também denominada por, ‘Galega’, ‘Galega miúda’, ‘Molar’, ‘Molarinha’, ‘Negroa’, ‘Negruça’, figura 1:A, encontra-se difundida por quase todo o país, com predominância nas regiões da Beira Interior, Ribatejo e Alentejo, em grande parte em olivais extensivos (Naveiro *et al.*, 2000). Já representou mais de 80% da superfície total dedicada à olivicultura em Portugal, mas tem vindo a perder expressão devido principalmente à dificuldade de multiplicação, à suscetibilidade a pragas e doenças e à dificuldade de adaptação aos sistemas de produção intensivos.

A variedade foi caracterizada tanto em termos agronómicos, como morfológicos e moleculares. A sua caracterização molecular, com as limitações inerentes a uma caracterização feita com base num único indivíduo de uma população pouco homogénea (Peixe, comunicação pessoal), é apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Caracterização Molecular da cv. 'Galega Vulgar', Pedro Fevereiro, ITQB / FC-UL.

Locus/Microsatélite	1º/2º Alelo	Massa Molecular	Locus/Microsatélite	1º/2º alelo	Massa Molecular
GAPU101 GA) ₈ (G) ₃ (AG) ₃	1º alelo	184	DCA15 (CA) ₃ G(AC) ₁₄	1º alelo	245
	2º alelo	200		2º alelo	268
GAPU103A (TC) ₂₆	1º alelo	160	DCA18 (CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	1º alelo	171
	2º alelo	196		2º alelo	180
GAPU71B GA(AG) ₆ (AAG) ₈	1º alelo	118	DCA3 (GA) ₁₉	1º alelo	237
	2º alelo	124		2º alelo	251
UDO99-028 (CA) ₂₃ (TA) ₃	1º alelo	150	DCA9 (GA) ₂₃	1º alelo	192
	2º alelo	174		2º alelo	194
EMO3 (CA) ₇	1º alelo	207	PA(GA)5 (GA) ₁₂	1º alelo	113
	2º alelo	209		2º alelo	126

(Cordeiro *et al.*, 2010).

A nível agronómico, a informação existente aponta para uma variedade em que as plantas apresentam vigor elevado, porte erguido, arborescência espessa e entrenós de tamanho médio (1-3 cm), características que dificultam a intensificação cultural. Ao se diminuírem as distâncias entre árvores na linha de plantação, verifica-se que a produção se limita à parte superior da copa. Apresenta entrada em produção precoce e produtividade elevada mas alternante. A capacidade de enraizamento varia entre alta por estacaria lenhosa, a baixa por estacaria semilenhosa sob nebulização (Naverro *et al.*, 2000). Tem apresentado boas taxas de enraizamento por propagação *in vitro* (Peixe *et al.*, 2003), ainda que sejam referidas variações em função dos clones utilizados (Jacob *et al.*, 2013). A época de floração é média, com a plena floração a registar-se na região de Elvas e ano médio, por volta do dia 10 de Maio. A maturação é muito escalonada, com início na primeira quinzena de Outubro prolongando-se até à segunda quinzena de Novembro (Peres *et al.*, 2012).

A caracterização morfológica aponta para inflorescências com comprimento e número de flores/inflorescência médio (18-25 flores) e folhas de forma elíptico-lanceolada, longas, com um comprimento (> 7 cm), de largura média (1-1,5 cm) e curvatura longitudinal do limbo plana, figura 1:B. Os frutos possuem peso baixo (<2 g) e relação polpa/carço baixa, apresentam forma ovoide, ligeiramente assimétricos, possuindo o diâmetro transversal máximo ao centro. O ápice é pontiagudo, sem mamilo e a base truncada. Possuem lenticelas abundantes e pequenas e apresentam elevada resistência ao desprendimento dificultando colheita mecânica. O endocarpo apresenta peso médio (0,3-0,45 g), forma elíptica, ligeiramente assimétrico, diâmetro transversal máximo ao centro, ápice e base pontiagudos, superfície rugosa, numero médio de ranhuras fibrovasculares e a terminação do ápice sem mamilo, figura 1:B.

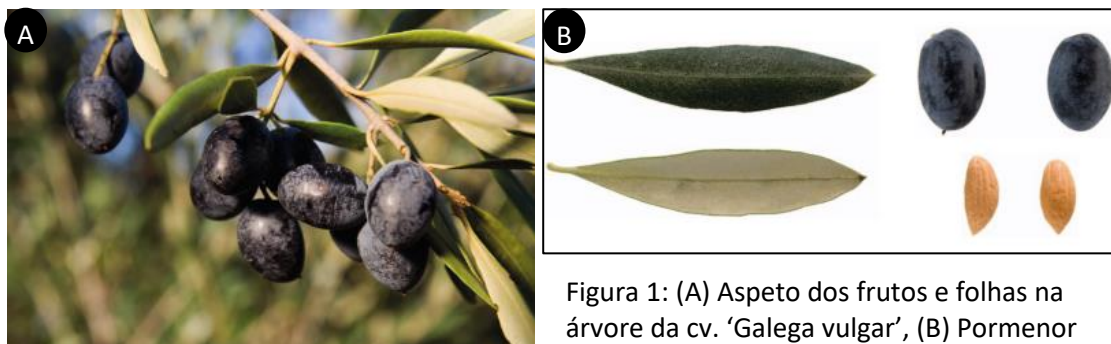


Figura 1: (A) Aspeto dos frutos e folhas na árvore da cv. 'Galega vulgar', (B) Pormenor das folhas, frutos e sementes da mesma cultivar. Adaptado de (Cordeiro *et al.*, 2010).

É uma variedade bastante resistente à verticiliose (*Verticilium dhaliae*, Kleb) e à seca, no entanto é suscetível à gafa (*Colletotrichum spp.*), alta incidência de tuberculose (*Pseudomonas savastanoi*), mosca da azeitona (*Bactrocera olea*, Gmelin), cochonilha (*Saissetia oleae*) e fumagina e baixa incidência de olho de pavão (*Spilocaea Oleagina*, Cast), sensível ao frio, salinidade e calcário ativo.

Trata-se de uma variedade com dupla aptidão, é bastante apreciada como azeitona de mesa já que apresenta fácil separação da polpa do caroço, e produz azeites de elevada qualidade e estabilidade apesar do seu rendimento em gordura ser médio a baixo. O azeite possui uma grande riqueza aromática (Peres *et al.*, 2002) e o seu conteúdo em ácido oleico e tocoferóis tornam-no um azeite diferente e facilmente distinguido de outras variedades (Gouveia *et al.*, 2003; Gouveia, 2007), apresentando alto conteúdo em vitamina E. Quando cultivada no Alentejo, normalmente apresenta sensações desde um frutado de maçã verde, com amargo e picante ligeiros, quando colhida em verde, até um frutado de amêndoa e frutos secos, com sensações de doce consideráveis e total ausência de amargo e picante quando colhida madura (Guia Azeites de Portugal, 2012). Apresenta baixo rendimento em azeite (<18%), sendo este pobre em ácido linoleico. A cultivar está incluída nas Denominações de Origem Protegida (DOP) "Azeites da Beira Alta", "Azeites da Beira Baixa", "Azeites do Ribatejo", "Azeites do Norte Alentejo", "Azeites do Alentejo Interior" e "Azeites de Moura".

2.3. Técnicas de propagação em *Olea Europaea*

2.3.1. Propagação por via seminal

A semente da oliveira está protegida por um endocarpo de elevada dureza que se apresenta como uma barreira à sua germinação. No entanto, uma vez removido o endocarpo e quebrada a dormência fisiológica do embrião através de tratamento com frio (60-90 dias a 4°C), as percentagens de germinação são significativamente elevadas (80-90%) (Cordeiro, comunicação pessoal). Podem pois ser facilmente obtidas oliveiras através da germinação de sementes. No entanto, este método não servirá para clonar cultivares já que cada semente dará origem a um indivíduo único, resultado da alogamia que caracteriza a espécie (Therios, 2009). As plantas assim obtidas são normalmente utilizadas pelos melhoradores de plantas, sendo o produto final de cruzamentos controlados, ou como porta-enxerto, nos quais posteriormente é enxertada a cultivar pretendida, normalmente cultivares de difícil enraizamento adventício. Trata-se no entanto de porta-enxertos francos com vigor diferenciado o que conduz à formação de olivais heterogêneos, comprometendo assim a sua gestão e mecanização (Therios, 2009).

Em condições normais, as plantas obtidas da germinação de sementes de oliveira começam a frutificar após 10 a 12 anos (técnicas de forçagem permitem já reduzir significativamente o período improdutivo) e possuem um sistema radicular profundo com uma raiz principal pivotante, enquanto plantas obtidas por métodos de propagação assexuada possuem um sistema radicular fasciculado e a primeira frutificação ocorre ao final de apenas 2 a 4 anos.

2.3.2. Propagação por enxertia

De acordo com Fabbri *et al* (2004), são multiplicadas anualmente por enxertia 7 milhões de plantas em todo o mundo. Ao realizar uma enxertia em oliveira pretende-se que a parte aérea da árvore pertença à cultivar que apresente os caracteres

agronômicos pretendidos, o enxerto, enquanto o sistema radicular irá corresponder ao porta-enxerto, selecionado pelo seu vigor, resistência a pragas e doenças e pela sua tolerância às condições edáficas do local.

Por uma questão de compatibilidade as enxertias são normalmente feitas entre variedades de *Olea europaea* subespécie *sativa* mas é possível a sua realização com sucesso utilizando como porta-enxerto a subespécie *sylvestris*. Um significativo grau de incompatibilidade pode ocorrer quando se tenta a enxertia em outro género dentro da família *Oleaceae* como por exemplo *Ligustrum*, *Forsythia*, *Syringa*, acabando as plantas por morrer num curto espaço de tempo (Therios, 2009).

A enxertia mecânica em bancada é a técnica mais utilizada comercialmente, realizada em bancadas de trabalho por mão-de-obra qualificada como uma operação em grande escala, foi proposta no passado por (Jacoboni & Fontanazza, 1976), tendo como objetivo principal a multiplicação de cultivares que não enraízam sob nebulização. A esta técnica podem ser aplicados diferentes métodos de enxertia, tanto de gomo como de garfo.

Ensaio realizados nos anos 60 e 70 do século XX tanto em Itália como na Califórnia, não indicam diferenças significativas nem generalizáveis em relação à produtividade, quando se comparam plantas enxertadas com a mesma cultivar autoenraizada (Guerriero *et al.*, 1972, 1974). Um exame mais detalhado dos resultados mostra no entanto comportamentos diferenciados em relação a outros parâmetros, como por exemplo o vigor das plantas. Plantas autoenraizadas da cultivar 'Moraiolo' apresentam-se menos vigorosas do que as plantas enxertadas da mesma cultivar, pelo menos nos primeiros anos de cultura. Já a cv. 'Frangivento' parece ter um comportamento oposto, enquanto a cv. 'Leccino', não apresenta diferenças. Plantas autoenraizadas da cv. 'Frantoio' apresentaram menor vigor quando comparadas com plantas da mesma cultivar enxertadas sobre franco, mas são mais vigorosas do que, quando a enxertia é feita sobre a cv. 'Lea'. Outras cultivares ('Manzanillo', 'Mission', 'Gordal') têm comportamento bastante diferenciado na comparação enxertado / auto-enraizado (Hartmann, 1990).

Em Portugal a cv. 'Carrasquenha de Elvas' e a cv. 'Blanqueta' têm sido enxertadas em porta-enxertos da cv. 'Galega Vulgar', obtendo-se assim árvores de maior vigor e mais resistentes à seca (Garcia, 1997).

2.3.2.1. Enxertia de gomo

A enxertia de gomo (borbulha, placa ou gomo destacado) é a mais utilizada em oliveira. Quando a enxertia é realizada em porta-enxertos com diâmetro inferior a 10mm, normalmente utiliza-se a enxertia de borbulha ou de gomo destacado, dependendo da época do ano em que se executa, verão, primavera e outono, respetivamente. A enxertia de placa, realizada sobre plantas com 2 ou mais anos de idade, pode ser feita ainda em viveiro, no solo, em contentores, ou no campo em local definitivo. Este tipo de enxertia pode ainda ser efetuado com as devidas adaptações em plantas com idade avançada, sendo nesse caso usado para substituição da variedade produtora em olivais já instalados, ou para a reparação de árvores que sofreram por exemplo danos mecânicos efetuados por máquinas.

2.3.2.2. Enxertia de garfo

Atualmente o método de enxertia de garfo mais utilizado para obtenção de plantas de oliveira é o de incrustação de topo sobre plantas com origem seminal. O método já foi testado para enxertia de plantas auto-enraizadas, tentando-se assim tirar partido da utilização de porta-enxertos clonais, mas o aumento do custo de produção por planta devido à utilização da técnica impede o uso comercial por parte dos viveiristas.

2.3.3. Propagação por Estacaria

2.3.3.1. Formação de raízes adventícias em oliveira – descrição do processo e suas condicionantes

A multiplicação por estacaria tem sido a forma mais comum de se obterem novas oliveiras por métodos de reprodução assexuada e depende da capacidade das estacas para formarem raízes adventícias. O enraizamento adventício pode ocorrer por duas vias, diretamente, por organogénese a partir de tecidos celulares estabelecidos, como o câmbio, córtex, periciclo ou feixes vasculares envolvendo rediferenciação celular, ou indiretamente, através de tecidos formados no calo desenvolvido por um dano mecânico, por exemplo um corte efetuado anteriormente na preparação do explante. Embora as duas vias possam ocorrer na mesma espécie, geralmente a via direta está relacionada com espécies de fácil enraizamento adventício (Ex: *Hedera hélix*) e a via indireta com espécies de difícil enraizamento adventício (Ex: *Pinus radiata*) (Altamura, 1996; Hartmann *et al.*, 1990).

Em *Olea Europaea* muitos autores observaram raízes adventícias formadas a partir do tecido cambial do caule, Bakr *et al.* (1977) na cultivar 'Wetaken', Salama *et al.* (1987), nas cultivares 'Manzanillo', 'Mission', 'Kalamata' e 'Hamed', e Ayoub & Qrunfleh (2006), nas cultivares 'Nabali' e 'Raseei'. Em cultivares portuguesas, estudos recentes publicados por Macedo *et al.* (2013), mostram que estacas de fácil enraizamento da cv. 'Cobrançosa' também apresentam formação de raízes adventícias com origem no tecido cambial. Os mesmos autores relatam que no caso de cultivares de difícil enraizamento como é o caso da cv. 'Galega Vulgar', os campos morfogénicos das raízes sempre foram encontrados em células do tecido caloso que se forma em torno da base da estaca, na região onde foi cortada.

Em variedades de fácil enraizamento foi também observado que a divisão celular ocorria apenas numa área localizada dos tecidos vasculares, deslocando fibras esclerenquimáticas deixando outras regiões inalteradas. Em variedades de difícil enraizamento, foi observado rápido desenvolvimento celular em todos os tecidos exceto a medula. A desagregação total do anel de esclerênquima, ainda que não resultando na organização de novas células para a formação do primórdio radicular, foi também observada. Estas observações levam os autores a afirmar que a baixa capacidade de enraizamento de algumas cultivares pode estar relacionada com a perda de competência a nível celular (Krisantini *et al.*, 2006).

O enraizamento adventício foi inicialmente considerado um processo fisiológico desenvolvido numa única etapa (De Klerk *et al.*, 1999; Friedman *et al.*, 1985; Jasik & De Klerk, 1997; Sircar & Chatterjee, 1973 cit. in Porfírio, 2015), mas, estudos histológicos e fisiológicos reclassificaram-no como um processo complexo de desenvolvimento, organizado numa sequência de etapas interdependentes, tendo cada uma os seus requisitos próprios (De Klerk, 1996; Gaspar *et al.*, 1992, 1997; Jarvis, 1986; Kevers *et al.*, 1997b; Rout *et al.*, 2000 cit. in Porfírio, 2015).

De acordo com Berthon *et al.* (1990), Heloir *et al.* (1996) e Pacurar *et al.* (2014), o processo de enraizamento adventício pode ser dividido em três fases; a indução, a iniciação e a expressão radicular.

A indução corresponde à fase em que ocorrem processos moleculares e bioquímicos ainda sem alterações histológicas visíveis; na iniciação têm início os primeiros processos histológicos como a organização do primórdio radicular, caracterizado pela ocorrência de pequenas células com grandes núcleos e citoplasma denso; por último, a expressão radicular compreende o desenvolvimento do ápice radicular, crescimento interno e emergência do primórdio radicular (Porfírio *et al.*, 2015).

Espécies lenhosas perenes, como a oliveira, mostram capacidade de enraizamento diferenciada entre cultivares (Fouad *et al.*, 1990), sendo influenciadas por fatores exógenos e endógenos, como a anatomia do caule, a bioquímica e o controlo genético, sendo que os seus efeitos permanecem em grande parte desconhecidos.

Uma das razões invocadas para a diferença de enraizamento observada entre espécies e cultivares dentro de uma espécie, relacionava-se com a anatomia do caule e a presença em alguns casos de um anel fibroso de esclerênquima que podia impedir a formação de raízes ou até a sua ligação aos sistemas vasculares da estaca, sendo assim apontado como uma possível barreira mecânica à emergência de raízes em cultivares recalcitrantes (Ciampi & Gellini, 1963; Qrunfleh *et al.*, 1994; Salama *et al.*, 1987). Os estudos mais recentes sobre este assunto mostram que, um anel deste tipo, mesmo com 3-6 camadas de células, não pode ser um fator limitante, uma vez que se desintegra durante o processo de enraizamento, mesmo em cultivares onde apenas ocorre a formação de tecido caloso e a formação de raízes não é atingida. (Ayoub & Qrunfleh, 2006, 2008). Na verdade, já em 1996, Altamura tinha referido que o anel de

esclerênquima não poderia limitar o enraizamento e ser causa de recalcitrância, por duas razões: (i) a expansão e desenvolvimento celular induzido pela ação do tratamento com auxina pode causar ruturas nessa barreira; (ii) o primórdio radicular poderá contornar essa barreira e emergir pela base da estaca.

Relativamente ao controlo bioquímico do enraizamento adventício, até à data são as auxinas os compostos que têm demonstrado maior efeito sobre o processo, sendo as mais utilizadas para induzir a formação de raízes adventícias em estacas (Preece, 2003; Rademacher, 2015). A principal auxina endógena é o ácido indole-3-acético (AIA), mas existem outras naturais como o ácido indole-3-butírico (AIB), o ácido 4-cloro-indole-3-acético (4-Cl-AIA), o ácido fenilacético (PAA), e outras sintéticas, como o ácido 1-naftalenoacético (ANA) ou o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O AIB foi originalmente sintetizado quimicamente e só posteriormente se descobriu a sua presença endógena em plantas, (Epstein *et al.*, 1989; Ludwig-Müller & Epstein, 1991 cit. in Porfírio, 2015) sendo a 2ª auxina endógena mais importante na formação de raízes adventícias.

As auxinas têm um papel importante na formação de raízes adventícias, mas são também responsáveis por promover a divisão celular, o crescimento dos caules, a divisão celular no câmbio vascular, o desenvolvimento do xilema secundário, controlando ainda o fototropismo e a dominância apical. As auxinas endógenas são sintetizadas nos embriões e em meristemas e tecidos jovens, como o ápice e jovens folhas (Ljung *et al.*, 2005). A partir destes tecidos de origem as auxinas podem ser transportadas passivamente por fluxo de massa através dos vasos condutores ou ativamente pelo câmbio vascular. Este tipo de transporte é independente da gravidade (Peer & Murphy, 2007) e é mediado por proteínas transportadoras Peer *et al.* (2011). O AIB pode ser reduzido a AIA através de um processo enzimático semelhante à oxidação dos ácidos gordos (Zolman *et al.*, 2000).

Vários estudos comprovam que o AIB (Rama & Pontikis, 1990) e o ANA (Chaari-Rkhis *et al.*, 2002; Zuccherelli & Zuccherelli, 2002; Brahadda *et al.*, 2003), ou a adição de poliaminas ao meio de enraizamento (Rugini *et al.*, 1990; Mencuccini, 1995; Zuccherelli & Zuccherelli, 2002), têm um efeito significativo na formação e alongamento de raízes em plantas de oliveiras.

Também as enzimas oxidativas têm sido relacionadas com a formação de raízes adventícias. Os primeiros relatos sobre o assunto sugerem por exemplo que os compostos fenólicos estimulam a formação de raízes em sinergia com o IAA, possivelmente através da inibição da enzima IAA-oxidase (IAAox) (Gorter, 1969 cit. in. Porfírio *et al.*, 2015).

Também o envolvimento e a importância da oxidase alternativa (AOX) na resposta das plantas a diversas condições de *stress* tem vindo a ser demonstrado e permitem considerar a AOX como enzima chave no processo de reprogramação celular associado ao enraizamento adventício (Macedo, 2005).

Relativamente às condições ambientais e mais propriamente em relação à temperatura, vários ensaios efetuados aconselham valores entre 20-26°C na base das estacas. Jacobini *et al.* (1977) consideram os 24-25°C como a temperatura ideal do substrato usado no enraizamento. Este aquecimento basal pode ser conseguido por circulação de água quente, vapor de água ou resistências elétricas na bancada usada para o enraizamento.

2.3.3.2. Estacaria lenhosa

A multiplicação por estacaria lenhosa implica o uso de material vegetal já lenhificado, com 2 ou mais anos de idade. As estacas mais utilizadas, com dimensões entre os 20 e os 50 cm e 5 a 10 mm de diâmetro, podem ser obtidas facilmente a partir da madeira de podas (Peixe *et al.*, 2003).

As estacas podem ser colocadas em viveiro no solo, tanto na horizontal como na vertical, ou em sacos de plástico na vertical. Ao fim do 2º ano no viveiro inicial, deverão ser mudadas para segundo viveiro, realizando-se uma poda radicular para promover a ramificação das raízes originando um sistema radicular de melhor qualidade. O solo do 1º viveiro deverá ser fértil e bem drenado, devendo ser regado. Já no 2º viveiro não se efetuam regas para promover adaptação das plantas às condições naturais de desenvolvimento no campo.

Apesar da facilidade de obtenção de material proveniente de podas, este método apresenta inconvenientes que comprometem o uso a nível comercial. Por um

lado, é difícil garantir a sanidade de todo o material recolhido; por outro, limitar a recolha a árvores que não apresentem sintomas de doenças irá limitar a sua disponibilidade. Outro inconveniente é o facto de se poder estar a multiplicar variedades indesejadas e a heterogeneidade presente em muitos olivais, podendo este ser da mesma variedade mas constituído por clones com património genético diferente (Barranco *et al.*, 1999).

2.3.3.3. Estacaria semilenhosa

Na multiplicação por estacaria semilenhosa são usados rebentos do ano, ou com um ano de idade, não lenhificados ou parcialmente lenhificados, sendo inúmeros os fatores que influenciam o processo, o que obriga a uma definição prévia da melhor conjugação de fatores em função da cultivar utilizada (Abazi, 2000 cit. in Oliveira *et al.*, 2003).

Para a variedade ‘Ascolano’ por exemplo, foram obtidos melhores resultados quando as plantas matrizes apresentavam maior vigor vegetativo e a indução do enraizamento se fazia com AIB na concentração de 3000 ppm e 5000 ppm, sendo recomendado 3000 ppm por ser mais económico (Oliveira *et al.*, 2003).

Por sua vez, estacas da cv. ‘I BardhiTiranes’ recolhidas em Maio, em desenvolvimento ativo, ou em Dezembro, em repouso vegetativo, apresentam diferentes reações à dopagem com AIB. Concentrações de 1000 ppm traduzem-se uma fraca reação e ineficiente enraizamento em ambas as fases, 3000 ppm conduzem aos melhores resultados em Maio, quando as concentrações de auxina endógena são mais elevados, e 5000 ppm em Dezembro, quando estas concentrações são mais baixas. (Ismaili & Lani, 2013).

A concentração de hidratos de carbono nas plantas matrizes de onde são recolhidas as estacas é outro fator que tem importância na formação do novo sistema radicular, e em oliveira, a presença de folhas e gemas nas estacas, favorece o processo de iniciação e crescimento de raízes (Fontanazza & Rugini, 1977; Avidan & Lavee, 1978; Caballero & Nahlawi, 1979).

O ambiente em torno das estacas deve ser muito húmido, de 80% a 90%, e com temperatura amena, o que se consegue mediante uso de nebulização intermitente (Proubi, 1998). A elevada humidade que se obtém, em câmara de nebulização, mantém vivas as estacas até que enraízem, já que faz baixar a temperatura e a transpiração da folha devido à formação de uma película de água sobre a mesma (Hartman & Kester, 1980; Rallo & del Rio, 1990).

No geral o material vegetal usado deve ser recolhido de plantas-mãe jovens, vigorosas, e em crescimento ativo. A idade e estado do material vegetal pode não influenciar espécies de fácil enraizamento, mas o mesmo não acontece nas de difícil enraizamento, em que a capacidade de enraizamento adventício das estacas decresce com o aumento de idade da planta-mãe (Lamb *et al.*, 1975).



Figura 2: Segmentos caulinares normalmente utilizados em estacaria semi-lenhosa. (A) Estaca Basal; (B) Estaca Média; (C) Estaca Apical. (Barranco *et al.*, 1999).

Em relação ao tipo de estaca, como pode observar-se na figura 2, podem utilizar-se estacas apicais, médias ou basais, em função da sua posição relativa no ramo de onde são recolhidas. Para evitar um excesso de transpiração ao nível das folhas e assim minimizar as perdas de água e nutrientes, todas as folhas à exceção dos dois pares situados na extremidade apical da estaca são removidos, antes do tratamento com reguladores de crescimento e da sua colocação em bancada de enraizamento.

São muito poucos os ensaios onde se compara o desempenho dos diferentes tipos de estaca. Recentemente, Ismaili & Lani (2013) fizeram um ensaio onde foram usadas estacas apicais, basais e médias da cv. 'I BardhiTiranes' e comparadas quanto ao seu enraizamento, tendo sido obtidos os melhores resultados com estacas do tipo apical para as diferentes concentrações de auxina testadas, 1000 ppm, 3000 ppm e 5000 ppm de AIB.

2.3.4. Óvulos

Óvulos são protuberâncias que podem encontrar-se na base do caule, na região de inserção das raízes com o caule, a denominada zona do colo. Estas hipertrofias produzem torções nos vasos condutores e diminuem a circulação da seiva, causando hipernutrição das células do câmbio, que proliferam, originando tecidos de parênquima onde se acumulam substâncias amiláceas, fontes de carbono, que favorecem a formação de rebentos e raízes, dependendo se a região do óvulo onde este processo ocorre, se encontra à luz ou no escuro. Os óvulos são plantados com compasso 0,6x0,3 metros, e o transplante realiza-se entre 3 a 5 anos, podendo o óvulo continuar a produzir novas plantas (Peixe *et al.*, 2003).

2.3.5. Micropropagação

2.3.5.1. Descrição geral

A micropropagação pode ser considerada um tipo específico de propagação por estacaria. A técnica utilizada para a oliveira consiste na indução de rebentação axilar sobre um segmento caulinar (Peixe *et al.*, 2003). Após o crescimento, os rebentos são separados em microestacas individuais que, após enraizadas, originam novas plantas, ou podem ser cortadas novamente em segmentos caulinares permitindo a sua multiplicação. Estes lançamentos axilares são repicados e colocados em meio de multiplicação até que se atinja o número desejado de plântulas pretendidas. Esses brotos são enraizados, aclimatizados e transplantados para o solo (Leva, 2011).

Recentemente a técnica tem sido referida por diversos laboratórios comerciais para a propagação de diversas variedades de oliveiras. Contudo, o custo final por planta continua a ser elevado e os fatores que mais contribuem para esse elevado custo são a falta de estabilidade na taxa de proliferação dos explantes, baixa percentagem de lançamentos radiculares e uma perda excessiva de plântulas enraizadas durante a fase de aclimatização (Leva, 2011).

Todo o processo de multiplicação *in vitro* baseia-se na possibilidade de se conseguir instalar a cultura em meio artificial em condições de assépsia total. Tem-se verificado no caso da oliveira a dificuldade de instalação sem o aparecimento de contaminações, quando se usa material vegetal recolhido de oliveiras adultas (Peixe *et al.*, 2003). O desenvolvimento de produtos como o Plant Preservative Mixture (PPM) tem ajudado a ultrapassar este problema pois possui ação fungicida e bactericida e pode ser adicionado a meios de cultura sem prejudicar o desenvolvimento dos tecidos vegetais (Peixe *et al.*, 2003).

O comportamento *in vitro* das microestacas é variável e influenciado por diversos fatores. De entre estes destaca-se, a fase juvenil ou adulta da planta de onde se recolhe o material para dar início à cultura *in vitro*, o genótipo da planta, o tipo de auxinas e a sua concentração e ainda o microclima conseguido *in vitro* (Leva, 2011).

Estacas uninodais produzidas a partir de ramos do ano em desenvolvimento ativo, são de momento o material de eleição para iniciar a micropropagação da oliveira. A taxa de multiplicação tem de ser superior a 3 em 30 dias. Números inferiores tornam a técnica pouco competitiva quando comparada com outros métodos e necessariamente economicamente inviável (Peixe *et al.*, 2003).

Quanto ao meio de cultura, o mais utilizado é o Olive Medium (OM), desenvolvido por Rugini em 1984 especificamente para a estimulação de gomos axilares e o crescimento de rebentos de oliveira. Poderá também ser utilizado o meio Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962, modificado por Fiorino & Leva, 1986). A composição do meio de multiplicação influencia as taxas de multiplicação e consequentemente a viabilidade do processo. Deste modo, têm-se procurado as formulações mais eficazes para a maioria das espécies com interesse comercial.

O meio OM desenvolvido para a oliveira contem manitol como fonte de carbono e Zeatina como regulador de crescimento, tendo-se provado que estes compostos são fundamentais para um bom desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (Rugini, 1984; Fiorino & Leva, 1986; Micheli *et al.*, 2009 cit. in Chaari-Rkhis *et al.*, 2010). A substituição da Zeatina (composto extremamente caro) por água de coco e BAP, foi conseguida com sucesso por Peixe *et al.* (2007) na cultura *in vitro* da variedade ‘Galega vulgar’, mas a substituição não tem resultado para outras cultivares.

Para a fase de enraizamento, a auxina ANA tem sido usada com sucesso nas variedades, ‘Frantoio’, ‘Dolce Agogia’, ‘Moraiolo’ e ‘Nebbiara’. Bons resultados têm sido obtidos também com o uso de AIB, nomeadamente quando usado em explantes juvenis de algumas variedades espanholas e em explantes maduros das variedades ‘Carolea’ e ‘Nocellara Etnea’, ‘Maderensis lowe’ e ‘Meski’ (Leva, 2011).

Apesar dos bons resultados obtidos com o enraizamento *in vitro*, o preço por planta ao ser usada esta técnica poderá ser drasticamente reduzido se o enraizamento poder ser efetuado *ex vitro*, evitando assim a manipulação em cultura asséptica e reduzindo significativamente a intensiva manipulação necessária ao processo. Na verdade, cerca de 60 a 80% do custo por planta micropropagada é devido a esta fase de enraizamento (Leva, 2011).

2.3.5.2. Fases do processo de micropropagação em oliveira

2.3.5.2.1. Escolha do explante inicial e colocação em cultura asséptica

De modo a se obter sucesso no estabelecimento de um protocolo de cultura *in vitro*, a escolha do explante inicial e a sua iniciação em cultura asséptica são aspetos bastante importantes. A escolha do explante inicial irá depender de entre outros fatores, da metodologia utilizada na propagação. Nos processos em que se promove a rebentação axilar, os novos explantes originam-se a partir de meristemas do explante inicial, sendo comumente utilizados fragmentos de caules com pelo menos 1 gomo, axilar ou terminal. Por outro lado nos processos de organogénese e embriogénese

somática, são utilizados explantes sem células meristemáticas preformadas, resultante por exemplo da fragmentação de folhas (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011).



Figura 3: Segmentos uninodais normalmente utilizados para iniciação em cultura asséptica (Peixe et al., 2007).

No que diz respeito à idade do explante inicial, explantes próximos da condição juvenil respondem invariavelmente melhor do que adultos ao processo de cultura *in vitro*, mas quando o objetivo é a multiplicação clonal de uma planta específica, em espécies alogâmicas a sua utilização está condicionada, pois conduziria a populações heterogêneas. Nesse caso, a obtenção de material vegetal com natureza juvenil é possível de obter com recurso a podas severas sobre a planta mãe, que forçam o desenvolvimento de ramos da base do tronco, onde estas características se manifestam.

Escolhido o explante inicial, é importante existir um compromisso entre a desinfecção dos mesmos e a sua taxa de sobrevivência, de modo a obter sucesso na sua instalação em cultura asséptica. Para cada espécie e tipo de explante, é necessário a realização de ensaios para se conseguir este compromisso visto o grau de infecção das superfícies dos tecidos ser muito variável.

Como desinfetantes podem ser utilizados em cultura *in vitro* por exemplo:

- o hipoclorito de cálcio em concentração 4-8% de cloro ativo, permite a evolução dos tecidos por não ser penetrante, sendo pouco estável em solução aquosa necessita preparação no momento do uso;

- o bicloreto de mercúrio em concentração 0,01-0,05%, é muito eficaz na esterilização, mas necessita de várias lavagens pois é de difícil remoção;
- o mercurobutol, contém detergente que aumenta seu poder de penetração e eficácia, mas é difícil de eliminar dos tecidos vegetais (Augé *et al.*, 1989).

Normalmente para instalação *in vitro* da oliveira são usados rebentos apicais, crescimentos do ano de 15 a 20cm de comprimento que foram cortados em segmentos uninodais com comprimento de 1 a 2 cm. Estes segmentos normalmente são lavados em água corrente pelo menos durante 30 minutos; de seguida emersos em solução sempre agitada com 12% de hipoclorito de sódio durante 8 minutos e finalmente são lavados 3 vezes em água destilada esterilizada.

As folhas são removidas e os segmentos colocados em meio de cultura OM para início da cultura.

2.3.5.2.2. Fase de Multiplicação

Durante esta fase a viabilidade de todo o processo de *propagação in vitro* está fortemente condicionada pelas taxas de multiplicação conseguidas; só poderão ser competitivas e aplicadas comercialmente se forem obtidas taxas de multiplicação elevadas, visto que o processo envolve um elevado nível de especialização da mão-de-obra e energia.

Vários são os fatores com influência sobre esta taxa, tais como, o genótipo, a composição do meio de cultura, as reservas e fonte de carbono, níveis e tipo de regulador de crescimento, luz e temperatura.

O uso de reguladores de crescimento, nomeadamente o BAP e a Zeatina, é fundamental. Estes têm o objetivo de promover crescimentos dos gomos axilares dos explantes, estimular a divisão celular e o crescimento, inibir o desenvolvimento de raízes e promover a organogénese nos *callus* celulares. Atrasam ainda a senescência e envelhecimento dos órgãos vegetais e promovem o desenvolvimento de cloroplastos e a expansão celular das folhas (Hartmann *et al.*, 1990).

Na maior parte das espécies lenhosas a proliferação de rebentos é conseguida a partir da evolução dos gomos axilares e adventícios, resultado da estimulação produzida pela aplicação de citoquininas exógenas. Os primeiros rebentos a surgir são os presentes nas axilas das folhas; os últimos são botões recém-formados na extremidade basal de rebentos (Hartmann *et al.*, 1990).

No caso da oliveira, os rebentos são caracterizados por uma forte dominância apical que influencia os seus hábitos de crescimento natural e que não pode ser suprimida *in vitro* através de tratamentos com citoquininas. Desta forma, a rebentação axilar de gomos adventícios tem pouca importância e a multiplicação de rebentos é conseguida a cada subcultura quando estes, após alongados, são segmentados em segmentos uninodais (Fabri *et al.*, 2004).

2.3.5.2.3. Fase de Enraizamento

Esta fase inicia-se depois de conseguida uma taxa de multiplicação aceitável. Características dos explantes como bons diâmetros do caule, um bom alongamento e desenvolvimento foliar durante a multiplicação, são características que estão fortemente ligadas a uma boa taxa de enraizamento.

O enraizamento de oliveiras *in vitro* foi reportado por Rugini *et al.* (1993) por indução do escurecimento do meio de enraizamento na presença de auxinas como AIB ou ANA ou substâncias como as poliamidas que favorecem a divisão celular e o crescimento.

Ao utilizarem micro estacas da cultivar de oliveira 'Galega Vulgar' Macedo *et al.* (2013), mostraram que os eventos correspondentes à fase de indução ocorrem nas primeiras 96 h após o tratamento com auxina, quando as células recuperam recursos meristemáticos. A partir das 96 h até às 336 h observam-se os primeiros meristemóides e zonas morfogenéticas da raiz.

Os eventos observados na fase de iniciação são seguidos por uma elevada atividade mitótica que eventualmente conduz à fase de expressão que se inicia 528 h após o tratamento com auxina.

A influência da iluminação no meio de enraizamento tem sido estudada usando carvão ativado de modo a provocar o escurecimento parcial ou total do meio. Estudos prévios suportam a possibilidade do carvão ativado absorver substâncias tóxicas libertadas pelos explantes e promover a formação de raízes (Mencuccini, 2002).

Foram confirmadas interações entre a capacidade de enraizamento e a intensidade da luz. Esta inibe o enraizamento e o método de escurecimento *in vitro* aumenta a percentagem de enraizamento quando a capacidade de enraizamento da cultivar é baixa (Mencuccini, 2002).

A técnica de escurecimento através da pintura dos frascos de preto e cobertura da superfície do meio com grânulos de policarbonato não é prática (Rugini *et al.*, 1993), e o uso de carvão ativado adicionado ao agar do meio (De Fossard *et al.*, 1978) facilita o desenvolvimento *in vitro* de muitas espécies mas na micropropagação da oliveira não traz resultados significantes (Canas *et al.*, 1992).

2.3.5.2.4. Fase de Aclimatização

A aclimatização é a última fase de todo o processo de obtenção de plantas por cultura *in vitro*. Devido às condições em que se desenvolvem (elevada humidade relativa e baixa intensidade luminosa), as jovens plantas enraizadas apresentam uma baixa taxa fotossintética, baixa densidade estomática e alterações na morfologia e funcionamento dos estomas; fatores que podem comprometer a sua taxa de sobrevivência. (Chaari-Rkhis *et al.*, 2010).

Características histológicas particulares foram observadas em folhas de oliveiras em cultura *in vitro*. Estas apresentam menor resistência à desidratação e dificuldade na aquisição da condição autotrófica. Plantas provenientes de cultura *in vitro* da cv. 'Nocellara del Belice' e da cv. 'Nocellara Etna', apresentam uma redução notável na espessura e diâmetro do feixe vascular central das folhas. A epiderme apresenta uma fina cutícula, densidade estomática baixa e o tecido em paliçada é composto por apenas

uma camada, em vez das 3 a 4 presentes nas plantas cultivadas no campo (Fabri et al., 2004).

2.4. Enraizamento *ex vitro* a partir de explantes produzidos *in vitro*

De acordo com o que nos foi possível apurar, Leva (2011), propôs até agora o único protocolo para o enraizamento *ex vitro* de explantes de oliveira enraizados *in vitro*. O principal objetivo desse trabalho foi a redução de custos associados à fase de enraizamento, programando um protocolo onde não se fazem as manipulações em condições de assépsia associadas aos métodos tradicionais de propagação *in vitro*. Para isso, propõem os autores que a fase de indução seja conseguida pela imersão rápida numa solução concentrada de regulador de crescimento (ANA a 500 ppm), com a fase de iniciação e expressão radicular a ser obtida em substrato orgânico (fibra de coco).

Nos ensaios foram usados explantes previamente cultivados *in vitro* das cultivares 'Maurino', 'Coratina', 'Correggiolo', 'Frantoio', 'Maremmano', 'Picholine' e 'S. Francesco'. Foram usados explantes com diferentes tempos de multiplicação *in vitro*, (225, 267 e 309 dias), correspondendo respetivamente a 5, 6 e 7 subculturas. Os explantes foram mantidos ou em luz contínua ou sob 16h de fotoperíodo, com uma intensidade luminosa próxima dos $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Todas as cultivares analisadas formaram raízes adventícias sendo tanto melhor o enraizamento quanto maior o número de subculturas previamente realizado antes da indução do enraizamento ser tentada. As taxas de enraizamento foram também condicionadas pela cultivar. A cultivar 'S. Francesco', apresentou alta capacidade de enraizamento, cerca de 76%. As cultivares 'Correggiolo' e 'Frantoio' apresentaram uma baixa capacidade de enraizamento, 28 e 40% respetivamente e as restantes cultivares, 'Picholine', 'Maurino', 'Maremmano', e 'Coratina' apresentaram capacidades de enraizamento entre os 62-72%. Verificou-se ainda que a presença de luz contínua foi fundamental para o sucesso deste protocolo. Na ausência de luz as microestacas não enraizaram e ocorre amarelecimento e abscisão foliar e extensa contaminação microbiana. Todas as microestacas enraizadas apresentavam 1 ou 2 novas folhas apicais que se desenvolveram ao longo do período de enraizamento. Mais de 90% das

microestacas enraizadas sobreviveram durante o processo de aclimatização, observando-se durante este a continuação do crescimento que já se tinha iniciado na fase de expressão e desenvolvimento radical.

3. Material e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Material Vegetal

Explantes uninodais de dois clones de oliveira da variedade ‘Galega vulgar’ cultivados e mantidos *in vitro* há vários anos no Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia da Universidade de Évora, foram utilizados como material de partida neste trabalho. Estes clones tiveram a sua origem num programa de seleção clonal iniciado pelo Prof. Antero Martins (Instituto Superior de Agronomia) e pelo Eng.^o Luís Santos (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária). Os cerca de 100 clones aí selecionados foram entretanto avaliados no âmbito do projeto Agro 683 (Desenvolvimento integrado de estratégias para a reabilitação da cv. ‘Galega vulgar’, como cultivar de charneira no património oleícola nacional), ao nível de alguns parâmetros agronómicos não influenciados pelas condições edafo-climáticas, como sejam a capacidade de enraizamento, o teor em gordura na matéria seca e a presença de vírus.

Por já se encontrarem instalados *in vitro*, por apresentarem comportamento contrastante ao nível da capacidade de enraizamento por estacaria semilenhosa e ainda por apresentarem elevados teores de gordura na matéria seca e bom estado sanitário (Tabela 2), foram selecionados para este trabalho os clones com a nomenclatura 1441 e 2022.

Tabela 2 – Parâmetros agronômicos relativos aos dois clones em estudo. Avaliação efetuada no âmbito do Projeto AGRO-683. Valores médios para 3 anos de observações.

Parâmetro Avaliado	Clone	
	1441	2022
Enraizamento médio por estacaria semilenhosa (%)	0,93	11,7
Infeção por vírus	*	Não
Gordura na matéria seca (%)	54,25	42,05

* Resultado negativo em RT-PCR mas inconclusivo em ds-RNA

3.1.2. Meios de Cultura

A formulação nutritiva de base, assim como a solução de vitaminas OM, ambas propostas por Rugini (1984) e cuja composição se apresenta na Tabela 3, foram utilizadas em todas as fases (multiplicação/alongamento e expressão do enraizamento) do processo de cultura *in vitro*.

Para a fase de multiplicação/alongamento, à formulação base foram adicionadas citoquininas, Zeatina (1mg L^{-1}) e BAP (2mg L^{-1}), e o meio foi gelificado pela adição de 0,7% de agar-agar.

Para a fase de expressão do enraizamento *in vitro*, a formulação de base foi utilizada sem adição de reguladores de crescimento e suplementada com 0,2% de carvão ativado.

Tabela 3 – Composição base do meio de cultura OM.

Macronutrientes	mg L⁻¹
CaCl ₂	332,2
KNO ₃	1100
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	600
KCl	500
MgSO ₄ 7H ₂ O	1500
KH ₂ PO ₄	340
NH ₄ NO ₃	412
Micronutrientes	mg L⁻¹
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3
H ₃ BO ₃	12,4
ZnSO ₄ 7H ₂ O	14,3
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
KI	0,83
Fe-EDTA	mg L⁻¹
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	41,30
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,85
Vitaminas	mg L⁻¹
Tiamina HCl	0,5
Ácido nicotínico	5
Piridoxina HCl	0,5
Ácido Fólico	0,5
Biotina	0,05
Glicina	2
Mio-inositol	100
Aminoácidos	mg L⁻¹
L-Glutamina	2194

(Rugini, 1984)

3.1.3. Substratos/contentores de enraizamento e aclimatização

O enraizamento dos explantes obtidos durante a fase de multiplicação, foi tentado tanto *in vitro*, em condições de assépsia, como *ex vitro*. No processo de enraizamento *in vitro*, após a indução radical ter sido conseguida pela imersão da base dos explantes numa solução concentrada de auxina (ver. 3.2.3), a expressão e desenvolvimento radical foi conseguida com a colocação dos explantes no meio de cultura utilizado para a fase de enraizamento tal como referido em 3.1.2.

No processo de enraizamento *ex vitro*, a indução radical também foi conseguida pela imersão das bases dos explantes numa solução concentrada de auxinas sendo posteriormente os explantes colocados em dois substratos de enraizamento, a saber:

- **Preformas® Jiffy** (Figura 4); trata-se de cubos humedecidos contendo uma mistura de 70% fibra de coco e 30% turfa com fertilização NPK ferro e cálcio e um pH situado entre 4,7 e 5,3. Os cubos são fornecidos em tabuleiros com 104 unidades cada, palatizados e plastificados para evitar a sua desidratação.

- **Pastilhas de fibra de coco prensada** (Figura 5); trata-se de pastilhas compostas 100% por fibra de coco prensada e desidratada, com elevada capacidade de expansão após hidratação sem qualquer tipo de fertilizante adicionado e com pH de 5,5.



Figura 4 - Aspeto das 'Preformas® Jiffy.



Figura 5 - Aspeto das pastilhas de fibra de coco prensada antes de hidratadas.

Todos os explantes onde o enraizamento foi conseguido, tanto *in vitro* como *ex vitro*, foram transferidos para tabuleiros alveolados de polipropileno, com formato retangular com 28 alvéolos e volume aproximado de 200 ml por alvéolo onde se colocou o substrato de aclimatização composto por areia, perlite e turfa, na proporção 1:1:3 (V/V) (Figura 6).



Figura 6: Tabuleiro alveolado com substrato de aclimatização e jovens plantas após enraizamento.

3.1.4. Outros Materiais

- Caixas de plástico (Figura 7); foram usadas para o enraizamento *ex vitro*. Com um volume de aproximadamente 500 ml e capacidade para 8 cubos Preformas® jiffy ou 8 pastilhas de fibra de coco prensada, permitem trocas com o exterior devido a pequena banda porosa existente na tampa; contudo garantem humidades relativas elevadas no interior das caixas.



Figura 7: Caixas utilizadas no processo de enraizamento *ex vitro*.

- Frascos de vidro (Figura 8); foram usados para as fases de multiplicação e enraizamento *in vitro*. Possuem um volume de 480 ml e tampa de vidro que necessita ser apertada com tiras de parafilm de modo que seja garantido um ambiente estéril mas sem que o aperto seja demasiado de modo a que permita trocas com o exterior e humidades elevadas no interior.



Figura 8: Frascos utilizados no processo de cultura *in vitro*.

- Tabuleiros alveolados (Figura 9); foram usados na fase de aclimatização. Trata-se de tabuleiros de polipropileno, com formato retangular com 28 alvéolos e volume aproximado de 200 ml por alvéolo.



Figura 9: Tabuleiros utilizados na fase de aclimatização.

- Estufins (Figura 10); foram utilizados para colocar os tabuleiros alveolados durante a fase de aclimatização. Trata-se de um conjunto de tabuleiro de polipropileno verde com cobertura de polietileno transparente e serviram para manter uma humidade relativa elevada durante os primeiros 15 dias de aclimatização, evitando a desidratação das jovens plantas.



Figura 10: Estufins utilizados na fase da aclimatização.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação do material vegetal

Para se conseguir o material vegetal usado nos ensaios de enraizamento, foi necessário reativar a multiplicação e alongamento em condições de assépsia de explantes previamente cultivados *in vitro*, num processo que demora aproximadamente 60 dias.

A primeira fase deste processo consistiu em segmentar os explantes previamente instalados *in vitro* em explantes uninodais desprovidos de folhas, com cerca de 1 cm e proceder à sua colocação em meio OM de multiplicação. Nesta fase são colocados cerca de 100 explantes por frasco de cultura (Figura 11-A).

A segunda fase é efetuada após aproximadamente 30 dias e consiste em remover o *calli* formado na base dos explantes uninodais, remover folhas da base que entretanto se desenvolveram e voltar a colocar os mesmos em meio de cultura fresco, com a mesma formulação (OM multiplicação) de modo a promover o seu alongamento. Neste caso ficam entre 20 a 30 explantes por frasco (Figura 11-B).

Passados aproximadamente mais 30 dias os explantes apresentam 8-10 entrenós e cerca de 6-8 cm e estão prontos para iniciar a fase de enraizamento (Figura 11-C). Nessa altura, selecionam-se de cada frasco cerca de 15 explantes, os mais desenvolvidos e mais vigorosos.

Para instalar o ensaio, as estacas apicais foram preparadas mantendo o gomo terminal e cortando a estaca ao 4º nó abaixo deste. Para preparação das estacas basais, a base da estaca onde se desenvolveu tecido caloso durante a fase de alongamento foi eliminada e as estacas foram preparadas cortando ao 4º nó visível contado a partir da extremidade basal. Tanto nas estacas basais como nas apicais mantiveram-se as 4 folhas da extremidade sendo eliminadas todas as outras.



Figura 11: Aspectos da evolução dos explantes até atingirem o desenvolvimento necessário para se iniciar a fase de enraizamento: (A) Estabelecimento da cultura por segmentos uninodais; (B) Desenvolvimento após 30 dias; (C) Desenvolvimento após 60 dias.

3.2.2. Esterilização e desinfecção de materiais

Tanto durante as fases de multiplicação/alongamento, como durante a fase de enraizamento *in vitro*, os explantes foram manuseados em condições de assépsia em câmara de fluxo laminar horizontal.

Para instalação da cultura e em todas as repicagens efetuadas, o material vegetal foi preparado em placas de Petri esterilizadas em estufa a 180°C durante 120 minutos. Etanol a 70° foi utilizado para desinfecção das mãos dos operadores e da superfície da câmara. O material de corte e manuseamento dos explantes (pinças, bisturis e lanças) foi desinfetado após cada utilização pela imersão prévia em etanol a 70° e posterior esterilização por altas temperaturas (250°C) usando um esterilizador de esferas de vidro e mantendo os instrumentos no esterilizador pelo menos durante 60 segundos.

3.2.3. Tratamentos para indução radical

Para promover a indução radical, os explantes foram submetidos a vários tratamentos de imersão rápida em soluções concentradas de auxinas (técnica de 'pulse'). Foram realizados tratamentos com duas auxinas, ANA e AIB, com duas concentrações (540 ppm e 3000 ppm) e 5 minutos de tempo de contacto para a concentração mais baixa e 10 segundos para a mais elevada.

Após a imersão no regulador de crescimento e para possibilitar a sua absorção os explantes estiveram 1 minuto em repouso antes de serem colocados no recipiente de cultura com meio de enraizamento OM. Nesta fase são colocados cerca de 10 explantes por frasco e as primeiras raízes são visíveis após 15-20 dias.

No que diz respeito à técnica de 'pulse' para o enraizamento *ex vitro*, a metodologia foi semelhante à usada no enraizamento *in vitro* com o mesmo método de corte e limpeza dos explantes. Contudo, neste caso, já não é necessário trabalhar em ambiente esterilizado de modo a assegurar as condições de assépsia. Os explantes são assim agrupados com a mão em grupos de 8, mergulhados no regulador de crescimento e colocados um a um em cada cubo Preformas® Jiffy ou pastilha de coco prensada.

Para ajudar à colocação dos explantes nos substratos, recorre-se ao uso de uma pinça, segurando a estaca na vertical e inserindo a pinça com a estaca no meio do substrato.

3.2.4. Preparação dos meios de cultura *in vitro*

3.2.4.1. Preparação das soluções mãe

- Solução mãe de Macronutrientes OM: Para a preparação da solução mãe de macronutrientes, pesaram-se todos os nutrientes e dissolveram-se separadamente em água destilada; após dissolvidos foram adicionados pela ordem apresentada na tabela 2, num balão contendo água destilada.

Pretendeu-se adicionar lentamente cada um de modo a que não ocorresse precipitação. A homogeneização da solução fez-se com recurso a um agitador magnético e por último perfez-se o volume desejado com água destilada.

Normalmente a solução de macronutrientes é 10 vezes concentrada. É necessário um maior cuidado na preparação da solução mãe de macronutrientes, visto os nutrientes serem requeridos em maiores quantidades, aumentando o risco de ocorrer precipitação.

- Solução mãe de Micronutrientes OM: A preparação da solução mãe de micronutrientes foi semelhante à preparação da de macronutrientes; neste caso a solução foi 100 vezes concentrada e pelos mesmos motivos, a adição dos nutrientes ao balão volumétrico seguiu a ordem apresentada na tabela 2.

- Solução mãe de Quelato de Ferro (Fe-EDTA): Para a preparação da solução Fe-EDTA pesou-se o sulfato de ferro e o $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ necessários ao volume pretendido; ambos foram dissolvidos separadamente em H_2O com auxílio de um agitador magnético; por fim foi adicionado o sulfato de ferro ao $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A adição deve ocorrer lentamente de modo a evitar que ocorra precipitação, pode ser aquecido ligeiramente para facilitar a dissolução. As concentrações utilizadas encontram-se na tabela 2.

- Solução mãe de Vitaminas OM: De modo a preparar a solução de vitaminas, as quantidades requeridas foram pesadas, separadamente dissolvidas em água destilada e adicionadas a um balão volumétrico seguindo a ordem apresentada na tabela 2. A solução foi 100 vezes concentrada. O ácido fólico foi dissolvido em $\text{NaOH} \ 1\text{N}$ e a biotina proveniente de uma solução mãe a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ previamente preparada. A solução de vitaminas é filtrada em ambiente estéril com filtro $0,22 \mu$ e adicionada ao meio após autoclavagem.

- Solução mãe de BAP: Para a preparação da solução mãe de BAP pesou-se a quantidade necessária num vidro de relógio no qual se adicionaram algumas gotas de NaOH 1N até se verificar a sua dissolução completa; posteriormente perfez-se o volume com água destilada, lavando bem o vidro de relógio.

A pesagem foi realizada em balança com precisão de 0,0001 g e a solução armazenada no frigorífico.

-Solução mãe de Zeatina: A solução mãe de Zeatina foi preparada de forma semelhante à descrita para a preparação da solução de BAP, com a diferença do armazenamento se realizar no congelador.

- Soluções mãe de AIB e ANA: Para a preparação da solução de reguladores de crescimento estes foram previamente pesados em balança de precisão 0,0001 g e dissolvidos num copo de precipitação, em algumas gotas de NaOH 1 N, com auxílio de agitador magnético. Perfez-se então o volume com água destilada lavando bem o copo de precipitação. O pH da solução foi ajustado $7 \pm 0,5$.

Por fim a solução foi filtrada em ambiente estéril com filtro 0,22 μ e armazenada no frio em frasco esterilizado coberto por papel de alumínio de modo a impedir a sua fotodegradação.

3.2.4.2. Preparação e esterilização do meio de multiplicação in vitro

Para a preparação do meio de multiplicação adicionaram-se num balão volumétrico contendo água destilada com capacidade para o volume de meio pretendido, as diferentes soluções mãe pela ordem apresentada na tabela 2, agitando constantemente com recurso a um agitador magnético.

De seguida são pesadas as vitaminas e aminoácidos que pelas quantidades a utilizar serem elevadas, não foram incluídas nas soluções mãe (myo-inositol e L-glutamina). Foi também adicionado o regulador de crescimento, BAP, que pode ser adicionado ao meio antes da sua esterilização.

Perfez-se o volume do balão volumétrico, transferiu-se para um copo de precipitação e ajustou-se o pH a 5,8. Após ajustado o pH, foi adicionada a fonte de carbono (manitol) e transferiu-se a solução para um Erlenmeyer contendo o agente gelificante (agar-agar), previamente pesado e esta solução base foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 40 minutos.

Depois do processo de esterilização adicionou-se o regulador de crescimento Zeatina e as vitaminas provenientes da solução *stock*, ambas filtradas e esterilizadas, usando um filtro de 0,22 μ . A adição de Zeatina, vitaminas e posterior distribuição do meio pelos frascos fez-se em ambiente estéril em câmara de fluxo laminar.

O meio de cultura foi então distribuído por frascos de vidro esterilizados (\pm 150 ml/frasco). Os frascos foram tapados após o meio ter solidificado e a tampa fixada com 2 tiras de película aderente, apertando a tampa ao frasco em cruz.

3.2.4.3. Preparação e esterilização do meio de enraizamento in vitro

O modo de preparação é semelhante ao do meio de multiplicação, como é apresentado na tabela 2, apenas com a diferença de não serem usados reguladores de crescimento no meio e ser adicionado carvão ativado de modo a se obter o escurecimento deste. Para uma distribuição uniforme do carvão ativado no meio, este não deve ser distribuído pelos frascos ainda quente; deve-se esperar que fique morno mas não demasiado frio para não solidificar.

A distribuição do meio pelos frascos fez-se em câmara de fluxo laminar seguindo o mesmo processo do utilizado para a preparação do meio de multiplicação.

3.2.4.4. Preparação dos substratos para enraizamento ex vitro e aclimatização

A preparação dos substratos iniciais destinados ao enraizamento *ex vitro* consistiu, na hidratação das pastilhas de fibra de coco prensada e disposição nas caixas dos Preformas® Jiffy.

As pastilhas de fibra de coco foram submersas em água durante 24 horas e posteriormente secaram durante 3 horas de modo a drenar a água em excesso, período após o qual foram colocadas nas caixas de enraizamento (Figura 7).

As plantas enraizadas nos substratos atrás referidos passaram depois para o substrato usado na aclimatização, composto por turfa, perlite e areia, na proporção de 3:1:1 V:V, mistura que foi feita manualmente até o mesmo apresentar uma aparência homogênea. Este substrato foi colocado em sacos de aproximadamente 5 litros, próprios para autoclave, esterilizado a 121°C e 1,2 bar durante 60 minutos, sendo depois armazenado até à sua utilização, altura em que foi distribuído nos tabuleiros alveolados de polipropileno (Figura 6).

3.2.5. Condições de Cultura

Em todas as fases do processo de cultura *in vitro* os explantes foram colocados numa sala de crescimento de plantas com temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa controladas. A sala foi programada para um fotoperíodo de 16 horas, uma intensidade luminosa de 44 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ conseguida pela utilização de lâmpadas fluorescentes Osram L 36W/840 *cool white* e uma temperatura dia/noite de 24°C / 22°C.

Na fase de expressão radicular as plantas continuaram o seu desenvolvimento em câmara de crescimento, com condições idênticas às descritas para a fase de cultura *in vitro* mas com uma intensidade luminosa de 81 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ à altura das plantas.

Para a fase de aclimatização, os tabuleiros com as plantas enraizadas foram colocados dentro de estufins (Figura 10) e passaram para uma câmara de aclimatização, com uma humidade relativa de 60%, temperatura dia/noite de 24/22°C, fotoperíodo de 16 horas e uma intensidade luminosa de 238 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ à altura das plantas, conseguida com a utilização de lâmpadas Osram L 18W/840 *cool white*. No que diz respeito aos estufins, estes permaneceram com as grelhas de ventilação completamente fechadas durante 1 semana. Após essa semana, foi aberta uma das 2 grelhas de ventilação, sendo a segunda aberta no final da 2ª semana. No final da 3ª semana foi retirada a cobertura de estufim e no final da 4ª semana as plantas foram transferidas para estufa.

A estufa encontra-se no Centro Experimental da Herdade da Mitra, localizado a sul de Évora, Portugal, tem uma cobertura em policarbonato alveolar, e está orientada no sentido SE - NO.

O sistema de controlo ambiental desta estufa inclui: Sistema de *cooling* (Bucklin, 1993) para arrefecimento, baseado num ventilador instalado num dos extremos da estufa e num painel celuloso humedecido localizado no outro extremo, e sistema de controlo de radiação baseado no emprego de uma rede de sombreamento, a funcionar manualmente.

Foram realizadas regas semanalmente com adubação NPK e micronutrientes a partir da 1ª semana nos estufins. Foi utilizada a seguinte formulação comercial, Fertilizante Plantas Verdes, Compo®, e a concentração de 5 ml/L⁻¹.

3.3. Delineamento experimental e análise de dados

Objetivo: Testar para os dois clones em estudo a viabilidade do enraizamento *ex vitro* comparando os resultados obtidos com o processo de enraizamento convencional em condições de assépsia (*in vitro*), sendo em ambos os casos a indução do enraizamento feita por imersão da base dos explantes numa solução concentrada de auxina.

O ensaio seguiu um delineamento em fatorial completo com 2 clones (1441 e 2022) * 3 substratos (meio de cultura OM, pastilhas de fibra de coco prensada e Preformas® Jiffy) * 2 Tipos de Estaca (apical e basal) * 2 auxinas (AIB e ANA) * 2 concentrações (540 ppm e 3000 ppm). Para as concentrações de 3000 ppm o tempo de contacto da base dos explantes com a solução de auxina foi de 10 segundos, sendo de 5 minutos para as concentrações de 540 ppm.

Para cada tratamento foram feitas 3 repetições. Cada repetição do enraizamento *in vitro* em meio de cultura OM era composta por 10 explantes enquanto cada repetição do enraizamento *ex vitro*, em pastilhas de fibra de coco prensada e em Preformas® Jiffy, era composta por 8 explantes, perfazendo assim um valor total de 1248 explantes para a totalidade do ensaio.

Foi avaliada a percentagem de enraizamento sendo os dados obtidos submetidos a análise de variância. Quando registadas diferenças significativas os dados foram

submetidos a uma análise de comparação de médias utilizando o teste de Fisher (LSD), considerando-se um nível de significância para $p \leq 0.05$.

A análise de dados foi efetuada recorrendo ao *software* STATISTICA 8.0 TM.

4. Resultados

Procurou testar-se para os dois clones em estudo a viabilidade do enraizamento *ex vitro* comparando os resultados obtidos com o processo de enraizamento convencional em condições de assepsia (*in vitro*).

O primeiro dado a reter tem a ver com o ensaio de enraizamento *in vitro* onde se observam taxas de enraizamento para as diferentes repetições que vão dos zero aos 100%. Esta grande disparidade nas taxas de enraizamento fica dever-se às contaminações de algumas das repetições realizadas em cada um dos tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de contaminação e enraizamento observadas no ensaio de enraizamento *in vitro*.

Número de recipientes em cultura*	% de contaminação dos recipientes	% de enraizamento nos recipientes contaminados	% de enraizamento nos recipientes não contaminados	% Média de enraizamento do ensaio
48	73	30	70	41

* No ensaio cada recipiente funcionava como uma repetição e continha 10 explantes

Como pode observar-se, 73% dos recipientes de cultura apresentavam os mais variados tipos de contaminação com fungos e/ou bactérias (Figura 12).

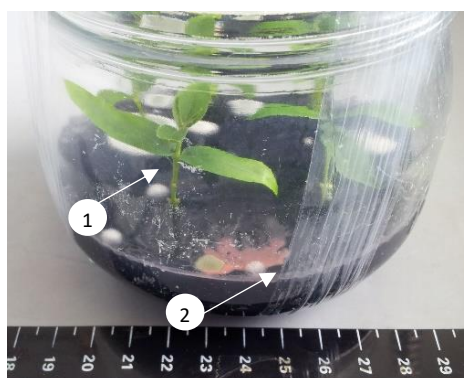


Figura 12: Contaminações; (1) Fungos, (2) Bactérias.

Estas contaminações influenciaram significativamente as taxas de enraizamento dos explantes, verificando-se uma correlação fortemente negativa ($r^2 = -1,0$) entre as taxas de enraizamento e as taxas de contaminação (Figura 13) e por esse motivo não foi possível comparar a eficácia deste processo de enraizamento com o enraizamento *ex vitro*, nem sequer avaliar ao nível do processo de enraizamento *in vitro* a influência do clone, da auxina, ou da sua concentração, nas taxas de enraizamento obtidas.

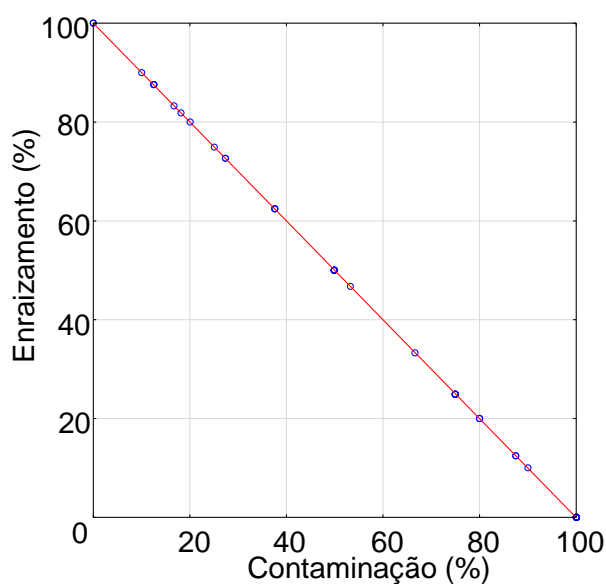


Figura 13: Correlação entre a taxa de enraizamento e a taxa de contaminação. $R^2 = -1,0$

Em relação aos recipientes de cultura, onde se observaram contaminações as taxas médias de enraizamento foram de apenas 30%, sendo de 70% para os casos onde não ocorreram contaminações, havendo vários casos em que os valores de enraizamento nos recipientes não contaminados atingiu os 100%.

Estes resultados atestam a eficácia deste processo de enraizamento para a oliveira, mas com a ressalva de que o mesmo exige uma forte experiência e preparação técnica do pessoal que o executa, por forma a evitar as contaminações dos explantes, o que dificulta a sua aplicação a nível comercial.

Quanto à análise dos resultados obtidos nos ensaios de enraizamento *ex vitro*, pode ver-se pela Tabela 5, onde se apresentam os resultados da análise de variância, que se observam diferenças significativas para 3 das 5 variáveis principais em estudo, a saber: o clone, o tipo de estaca e o substrato.

Para além disso e ainda pela observação dessa tabela, verifica-se que foram também registadas diferenças significativas ao nível das interações entre as variáveis analisadas. Por exemplo, o comportamento dos clones foi fortemente dependente do substrato e da concentração de auxina utilizada. O tipo de estaca apresentou comportamento diferenciado em função do substrato de enraizamento e, tanto a auxina utilizada como a sua concentração, interagiram com o substrato e com o clone, dando origem a respostas diferenciadas.

Tabela 5 – Valores da análise de variância apresentando todos os casos em que se observaram diferenças significativas para $p \leq 0,05$.

Variável	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Clone	12909,9	1	12909,9	24,2942	0,000006
Estaca	44564,9	1	44564,9	83,8631	0,000001
Substrato	7668,2	1	7668,2	14,4301	0,000326
Clone*Substrato	2849,1	1	2849,1	5,3615	0,023802
Estaca*Substrato	9109,2	1	9109,2	17,1419	0,000103
Clone* [] Auxina	3387,2	1	3387,2	6,3741	0,01407
Clone*Estaca*Substrato	4573,8	1	4573,8	8,6071	0,004643
Clone*Auxina* [] Auxina	4644,9	1	4644,9	8,7408	0,004353
Substrato*Auxina* [] Auxina	6099,9	1	6099,9	11,4789	0,001209

Os intervalos de confiança a 95% para a percentagem de enraizamento, em função das variáveis principais, clone, tipo de estaca e substrato são apresentados nas figuras 14, 15 e 16.

É possível observar que o clone 1441 atingindo valores médios de enraizamento de 63% para o conjunto de todos os tratamentos, teve um comportamento significativamente melhor que o clone 2022, onde o enraizamento médio não ultrapassou os 40% (Figura 14).

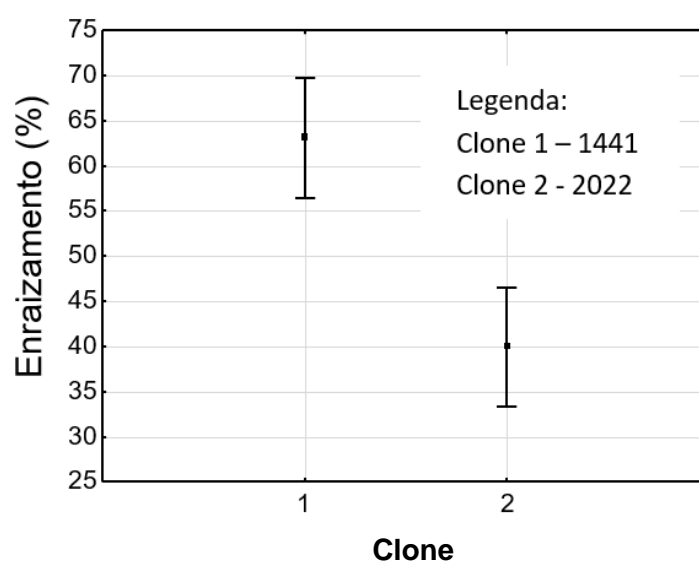


Figura 14: Variação do enraizamento em função do clone. (LSD 95%).

Em relação ao tipo de estaca (Figura 15), verifica-se que os melhores resultados são obtidos quando se utilizam estacas basais, com valor médio de enraizamento superior a 70%, contra os 30% obtidos com as estacas apicais.

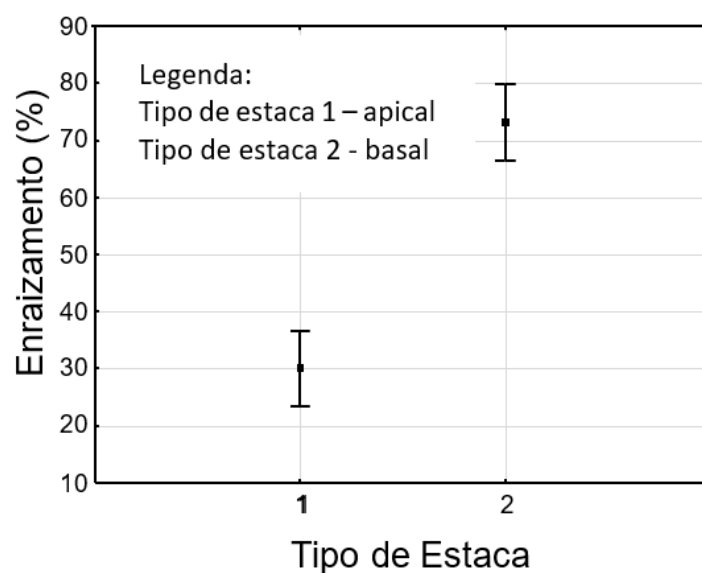


Figura 15: Variação do enraizamento em função do tipo de estaca. (LSD 95%).

Em relação aos substratos de enraizamento, observa-se que nas pastilhas de fibra de coco prensada a percentagem média de enraizamento foi de 61%, valor significativamente superior ao conseguido com as Preformas[®] Jiffy, onde não foi além de 43% (Figura 16).

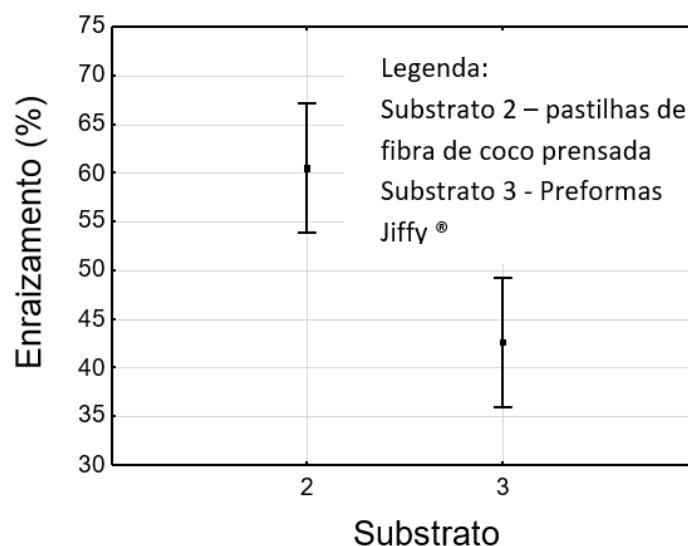


Figura 16: Variação do enraizamento em função do substrato (LSD 95%).

Ao efetuar uma análise mais pormenorizada sobre o comportamento do enraizamento em função das interações entre as variáveis em estudo, verificamos que, no caso da interação clone/substrato (Figura 17) as diferenças significativas anteriormente referidas resultaram de um melhor comportamento do clone 1441 quando o enraizamento se fez em pastilhas de fibra de coco prensada (78%). Não há diferenças significativas entre substratos para o clone 2022, nem diferenças entre clones quando se usa o substrato Preformas[®] Jiffy.

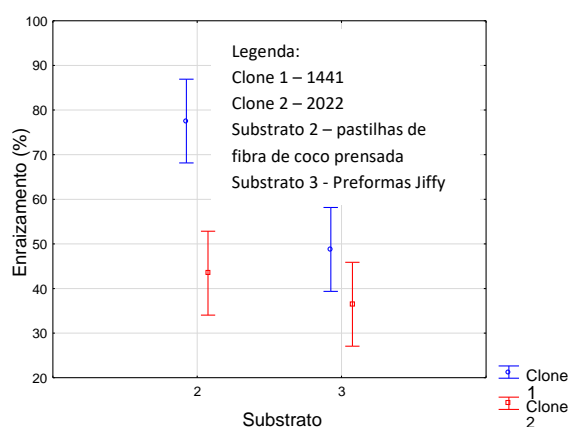


Figura 17: Comportamento do enraizamento para a interação clone*substrato. (LSD 95%).

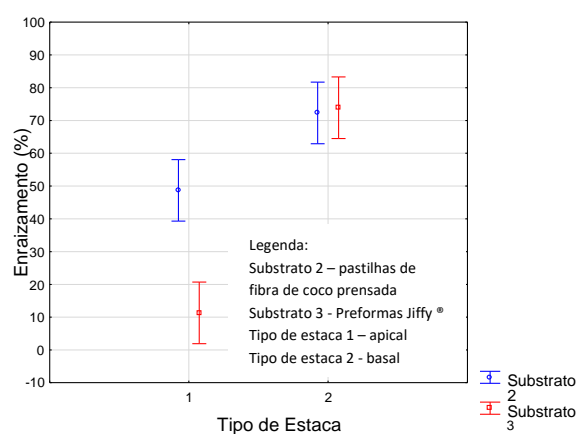


Figura 18: Comportamento do enraizamento para a interação tipo de estaca*substrato. (LSD 95%).

Relativamente ao tipo de estaca e à forma como o substrato condicionou o seu enraizamento, pode ver-se pela Figura 18 que as diferenças significativas registadas se ficam a dever ao comportamento das estacas apicais, com taxas de enraizamento significativamente menores que as basais em qualquer um dos substratos testados.

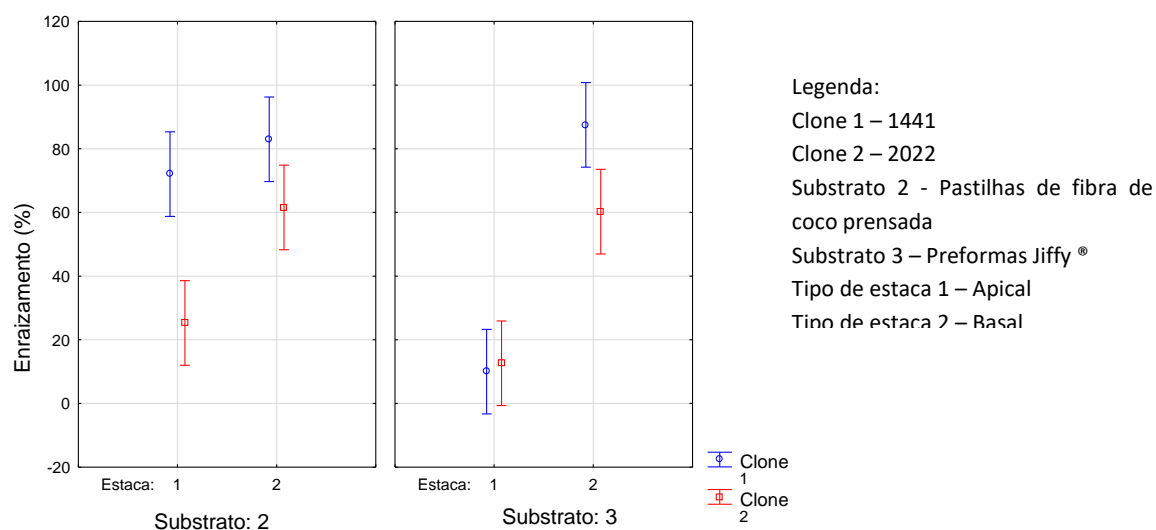


Figura 19: Taxas de enraizamento observadas em função da interação tripla entre as variáveis clone*tipo de estaca*substrato. (LSD 95%).

A análise da interação tripla entre estas variáveis, apresentada na figura 19, permite confirmar o melhor comportamento das estacas basais em relação às apicais, mostrando para além disso que o melhor desempenho do clone 1441 em relação ao clone 2022 fica a dever-se principalmente ao comportamento das estacas apicais do primeiro no substrato pastilhas de fibra de coco prensada, onde o enraizamento foi significativamente superior a qualquer outro tratamento onde este tipo de estacas foi utilizado. A essa mesma razão se devem as diferenças anteriormente observadas entre os substratos. Realmente, só neste caso, o enraizamento observado no substrato pastilhas de fibra de coco prensada, foi significativamente superior ao observado no substrato Preformas[®] Jiffy.

Se nos alhearmos deste comportamento das estacas apicais do clone 1441, podemos dizer em jeito de conclusão que, ainda que os clones em estudo tenham mostrado algumas diferenças na sua capacidade de enraizamento, com o clone 1441 a apresentar taxas médias superiores ao clone 2022, foi no entanto o tipo de estaca a variável que mais condicionou a taxa de enraizamento nestes ensaios, sendo o comportamento das estacas basais significativamente superior ao das estacas apicais.

Mas os resultados da análise de variância indicam também (Tabela 5) a existência de diferenças significativas para os valores do enraizamento em função da interação Clone/ Concentração de Auxina. Como pode ver-se pelos dados apresentados na figura 20, essas diferenças ficam a dever-se ao comportamento dos clones, especialmente do clone 1441, que apresenta resultados significativamente melhores que o clone 2022 quando o enraizamento é tentado com a concentração de auxina a 540 ppm. Para cada um dos clones individualmente, não há registo de diferenças significativas nas percentagens de enraizamento em função da concentração de auxina utilizada.

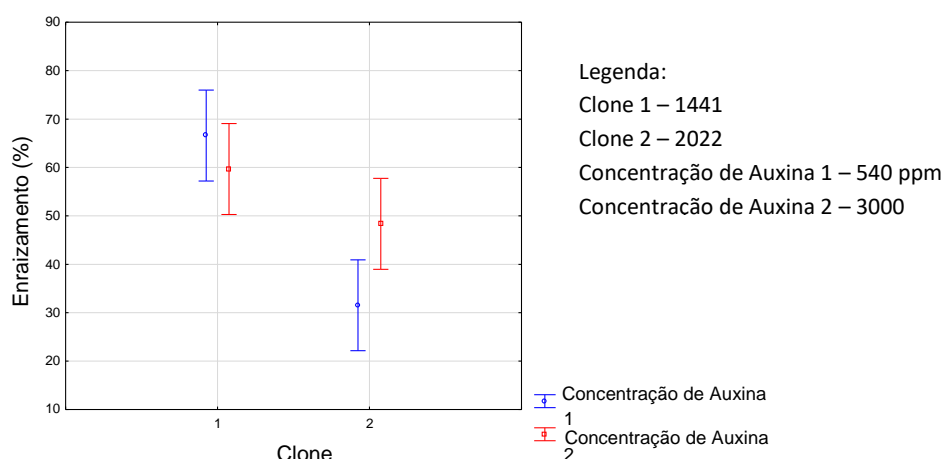


Figura 20: Taxas de enraizamento observadas para a interação clone*concentração de auxina. (LSD 95%).

Para procurar compreender estas diferenças de enraizamento registadas para os clones em estudo em função da concentração de auxina utilizada no processo de indução, apresenta-se na figura 21 o resultado da interação tripla Clone/Auxina/Concentração de auxina. Como pode ver-se, os melhores resultados obtidos para o clone 1441, resultam principalmente do seu comportamento quando a indução é feita com ANA na concentração de 540 ppm. Nesse caso, os valores obtidos são significativamente superiores aos conseguidos para as mesmas condições, com o clone 2022. Em todos os restantes casos não se registam diferenças significativas no comportamento dos dois clones. Também não se registam diferenças significativas quando os resultados obtidos para o clone 1441 com indução em ANA a 540 ppm são comparados com a utilização de AIB a 3000 ppm, aspeto que tem alguma relevância já que este último tratamento está hoje mais ou menos generalizado para a indução do enraizamento em estacas semilenhosas de oliveira.

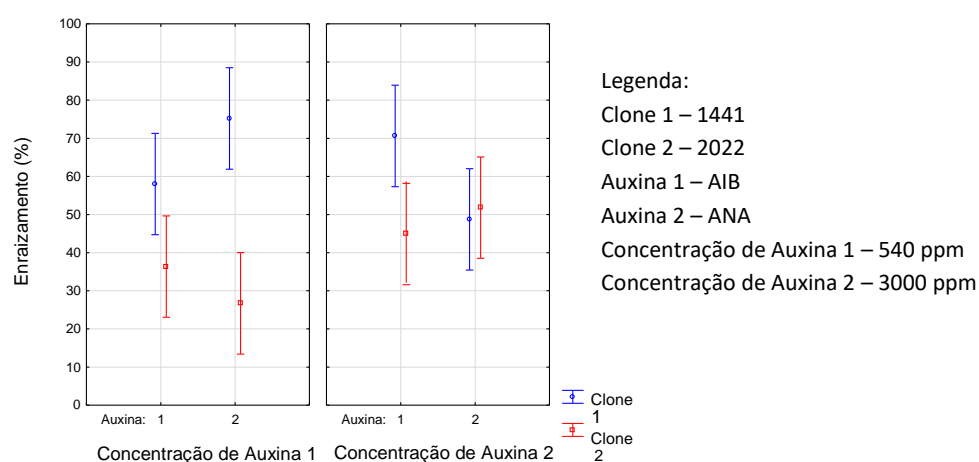


Figura 21: Comportamento do enraizamento no caso da interação tripla clone*auxina*concentração de auxina. (LSD95%).

De acordo com os dados até agora analisados pode dizer-se que os melhores resultados serão obtidos com a utilização de estacas basais do clone 1441, independentemente do substrato usado, da auxina e da sua concentração. Uma maximização dos resultados consegue-se utilizando as estacas basais deste mesmo clone e ANA a 540 ppm ou AIB a 3000 ppm.

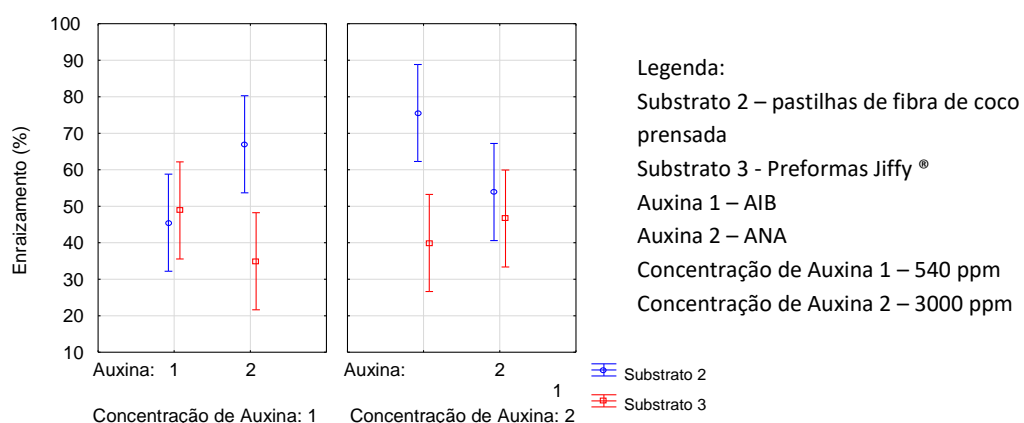


Figura 22: Variação do enraizamento para a interação tripla substrato*auxina*concentração de auxina. (LSD 95%).

Diferenças significativas também se observam para a interação tripla Substrato/Auxina/ Concentração de Auxina (Figura 22), mas tal como acontecia para a interação Clone/Auxina/ Concentração de Auxina, ficam a dever-se a diferenças entre os clones e não aos diferentes níveis dos fatores testados dentro do mesmo clone. Os dados permitem no entanto completar a informação anterior, indicando que, para conjugação de fatores anteriormente enumerados, os melhores resultados se obtêm com a utilização do substrato pastilhas de fibra de coco prensada.

Tabela 6: Valores médios das taxas de aclimatização conseguidas em cada um dos tratamentos efetuados no ensaio de enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. Valores em %.

Substratos e auxinas	clone 1441, estaca Apical	clone 1441, estaca basal	clone 2022, estaca apical	clone 2022, estaca basal
Meio de cultura, AIB, 540 ppm	100	100	89.47	100
Meio de cultura, AIB, 3000 ppm	100	100	85	100
Meio de cultura, ANA, 540 ppm	100	100	88.89	100
Meio de cultura, ANA, 3000 ppm	100	100	91.67	100
Fibra coco, AIB, 540 ppm	100	100	100	100
Fibra coco, AIB, 3000 ppm	100	100	100	100
Fibra coco, ANA, 540 ppm	100	100	100	100
Fibra coco, ANA, 3000 ppm	100	100	100	100
Preformas®, AIB, 540 ppm	100	100	100	100
Preformas®, AIB, 3000 ppm	100	100	100	100
Preformas®, ANA, 540 ppm	100	94.74	100	100
Preformas®, ANA, 3000 ppm	100	100	100	100

No que diz respeito à aclimatização (Figura 23), obtiveram-se taxas de sobrevivência elevadas para todos os substratos e todos os tratamentos usados no enraizamento, como é possível observar na tabela 6 as taxas são superiores a 85% para qualquer um dos tratamentos.

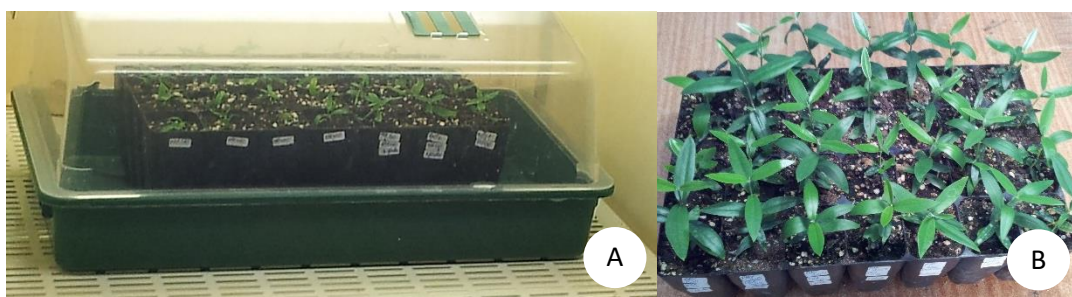


Figura 23: Aspeto das plantas em aclimatização. (A) Início da aclimatização, plantas em estufim. (B) Plantas 20 dias após o início do processo de aclimatização, já sem estufim e aptas para aclimatização em estufa.

5. Discussão

Das variáveis analisadas neste trabalho, o tipo de estaca (apical ou basal), foi claramente a que mais fortemente condicionou o enraizamento *ex-vitro* da cultivar de oliveira em estudo ('Galega vulgar'). O grau de atempamento da estaca e consequentemente a relação C/N dos tecidos, assim como uma esperada distribuição diferenciada dos reguladores de crescimento ao longo do ramo, são razões suficientes para pensarmos que a posição da estaca num ramo pode condicionar a resposta ao enraizamento. Ainda assim, tanto quanto nos foi possível saber, de todos os trabalhos realizados até agora sobre enraizamento de estacas de oliveira, apenas um avalia a esta variável e a sua influência na capacidade das estacas para formarem raízes adventícias. Trata-se de um ensaio realizado por Ismaili & Lani, em 2013. Partindo de estacaria semilenhosa os autores avaliam entre outros fatores a posição da estaca no ramo (apical, média e basal), concluindo que os melhores resultados se obtêm com a utilização de estacas apicais. Estes resultados não estão de acordo com os obtidos na presente dissertação, onde as estacas basais apresentam um melhor desempenho, mas, tratando-se da aplicação de metodologias distintas, os resultados obtidos não são comparáveis. De qualquer modo, a existência de comportamento diferenciado, tanto em estacaria semilenhosa como em explantes provenientes de cultura *in vitro*, confirma que o tipo de estaca utilizado pode efetivamente condicionar o enraizamento das cultivares e mesmo dos clones dentro de cada uma delas.

No que diz respeito às diferenças observadas entre os clones (cl. 1441 e cl. 2022), estas eram espectáveis e estão de acordo com os inúmeros trabalhos que apontam para esse facto. De entre estes, salientamos dois dos mais recentes, Mencuccini (2002) e Leva (2011). Ambos os autores referem que a capacidade de propagação *in vitro* da oliveira (*Olea europaea* L.), depende entre outros fatores internos e externos, da genética do material vegetal utilizado. De acordo com Fouad et al. (1990), os diferentes clones podem reagir de forma distinta às condições de cultura a que estão sujeitos, como, a intensidade luminosa, fotoperíodo e temperatura, assim como à aplicação de reguladores de crescimento, o seu tipo e concentração.

Dos vários fatores enumerados por Fouad et al. (1990), os reguladores de crescimento são talvez a variável mais estudada em ensaios de enraizamento de oliveira. Desses estudos são exemplo os trabalhos de Rama and Pontikis (1990), Chaari-Rkhis et al. (2002), Zuccherelli and Zuccherelli (2002), Brahadda et al. (2003), Preece (2003), Peixe et al. (2003) ou Rademacher (2015). De um modo geral os trabalhos atrás enumerados comprovam que a oliveira responde positivamente à aplicação externa de auxinas e que estas podem ser aplicadas por imersão rápida da base das estacas na solução (10-20s numa solução de 3000-5000ppm), ou, no caso da cultura *in vitro*, por adição ao meio de cultura ($1 - 3 \text{ mgL}^{-1}$).

De acordo com o que nos foi possível avaliar, Leva (2011) realizou até à data o único ensaio onde se tentou enraizamento *ex vitro* de explantes de oliveira produzidos *in vitro*, sendo a indução do enraizamento efetuada através da imersão da base dos explantes em ANA numa concentração de 500 ppm. Foram testadas 7 cultivares de oliveira, 3 tempos de permanência dos explantes em cultura *in vitro* (5, 6 e 7 subculturas) antes do ensaio de enraizamento e fotoperíodos de 24 e 16 horas. Os resultados, variando entre 28 e 76% de enraizamento, foram condicionados tanto pela cultivar como pelo fotoperíodo e pelo tempo de permanência dos explantes em cultura *in vitro* antes do enraizamento. Os autores referem que, independentemente da cultivar, os melhores resultados se obtiveram com luz contínua e com explantes com maior números de subculturas *in vitro* antes do enraizamento.

No nosso caso, pelo facto de os explantes estarem em cultura *in vitro* há muito tempo (cerca de 10 anos), o número de subculturas não foi considerado como variável. Tal como aconteceu no trabalho de Leva (2011), onde se observaram diferenças entre as cultivares, também no nosso caso os clones apresentaram comportamento diferenciado, confirmando a influência do genótipo no processo de formação de raízes adventícias.

Relativamente às auxinas utilizadas, testámos duas (AIB e ANA), verificando que este também deve ser um fator a avaliar neste tipo de ensaios, o que não aconteceu nos ensaios de Leva (2011). De acordo com os dados obtidos observamos que as maiores concentrações de AIB (3000 ppm) e as menores concentrações de ANA (540 ppm) conduziram aos melhores resultados. Pode assim inferir-se que no caso do AIB a

concentração usada de 540 ppm pode não ser suficiente para uma eficiente estimulação do enraizamento, enquanto a concentração de 3000 ppm no caso do ANA pode já provocar um efeito de toxicidade, levando ambos a percentagens de enraizamento mais baixas. Trabalhar com uma única auxina numa única concentração não permitirá em muitos casos potenciar os resultados.

Os nossos resultados, assim como os obtidos por Leva (2011) revelam boas taxas de enraizamento com a utilização de ANA. No entanto, sempre que estes não apresentem diferenças significativas quando comparados com a utilização de AIB, como no nosso caso, sugere-se a utilização desta última auxina. Quanto comparado com o ANA, o AIB é mais estável e entre o eficiente e o tóxico tem um intervalo de segurança ao nível da concentração aplicada muito superior ao ANA, para além disso, desde há muito que o AIB é utilizado na promoção do enraizamento em estacaria de oliveira, havendo por isso muita informação sobre a mesma.

O parâmetro duração do fotoperíodo, que condicionou o enraizamento nos ensaios de Leva (2011) não foi por nós testado, mas, tendo em conta as elevadas taxas de enraizamento que conseguimos com um fotoperíodo de 16 horas, será difícil prever melhores resultados pela aplicação de luz contínua, ainda que a avaliação deste parâmetro deva ser considerada em trabalhos futuros.

Ao nível da aclimatização, tal como se esperava, porque esta fase do processo nunca foi um problema para a oliveira, os resultados obtidos, com a sobrevivência de 85-100% das plantas enraizadas, confirmam os valores de referência que se encontram na revisão bibliográfica efetuada.

6. Conclusões

Tendo em conta os resultados obtidos é possível concluir que os objetivos a que nos propusemos foram alcançados. Apesar de não ser possível a comparação entre os métodos de enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, devido à influência das contaminações ocorridas com o primeiro destes procedimentos, foram obtidos resultados bastante animadores no enraizamento *ex vitro*, com taxas superiores a 80% para alguns dos tratamentos, sendo assim possível afirmar que esta técnica apresenta forte possibilidade de aplicação a nível comercial, já que atinge valores de enraizamento próximos dos conseguidos *in vitro* e simplifica efetivamente os procedimentos, reduzindo assim os custos de produção das plantas.

Num processo de propagação *in vitro* de plantas, as contaminações podem ocorrer em várias fases ao longo do mesmo. Quando estas surgem durante as fases de multiplicação e alongamento *in vitro* não têm influencia direta sobre o enraizamento, visto serem excluídos todos os frascos contaminados durante estas fases, mas irão afetar bastante a taxa de multiplicação dos explantes, levando a uma passagem de menos material para a fase de enraizamento.

Com influência direta sobre o enraizamento apresentam-se as contaminações que ocorrem durante a preparação dos explantes para esta fase, quando realizada *in vitro*, e que resultam de uma contaminação do explante durante a imersão na solução concentrada de regulador de crescimento, ou do próprio meio de cultura durante a sua preparação. Durante o manuseamento dos explantes as contaminações podem surgir devido a incorreta esterilização dos materiais ou superfícies de trabalho, ou ainda e maioritariamente, por parte dos operadores. No caso da indução por 'pulse', as contaminações podem também surgir devido à incorreta esterilização e filtração do regulador de crescimento. No que diz respeito ao meio de cultura, as contaminações podem ser devidas a incorreta esterilização, ou surgir por manipulação incorreta na fase de espalhamento para os frascos, na altura da adição das vitaminas ou reguladores de crescimento estéreis, ou ainda durante a colocação dos explantes.

Como pode ver-se pela figura 24, para o processo de enraizamento *ex vitro*, depois da fase de multiplicação, todo o processo de indução e expressão do enraizamento é desenvolvido em condições não assépticas, reduzindo assim significativamente o efeito nefasto das contaminações que ocorrem quando o processo se desenvolve *in vitro*.

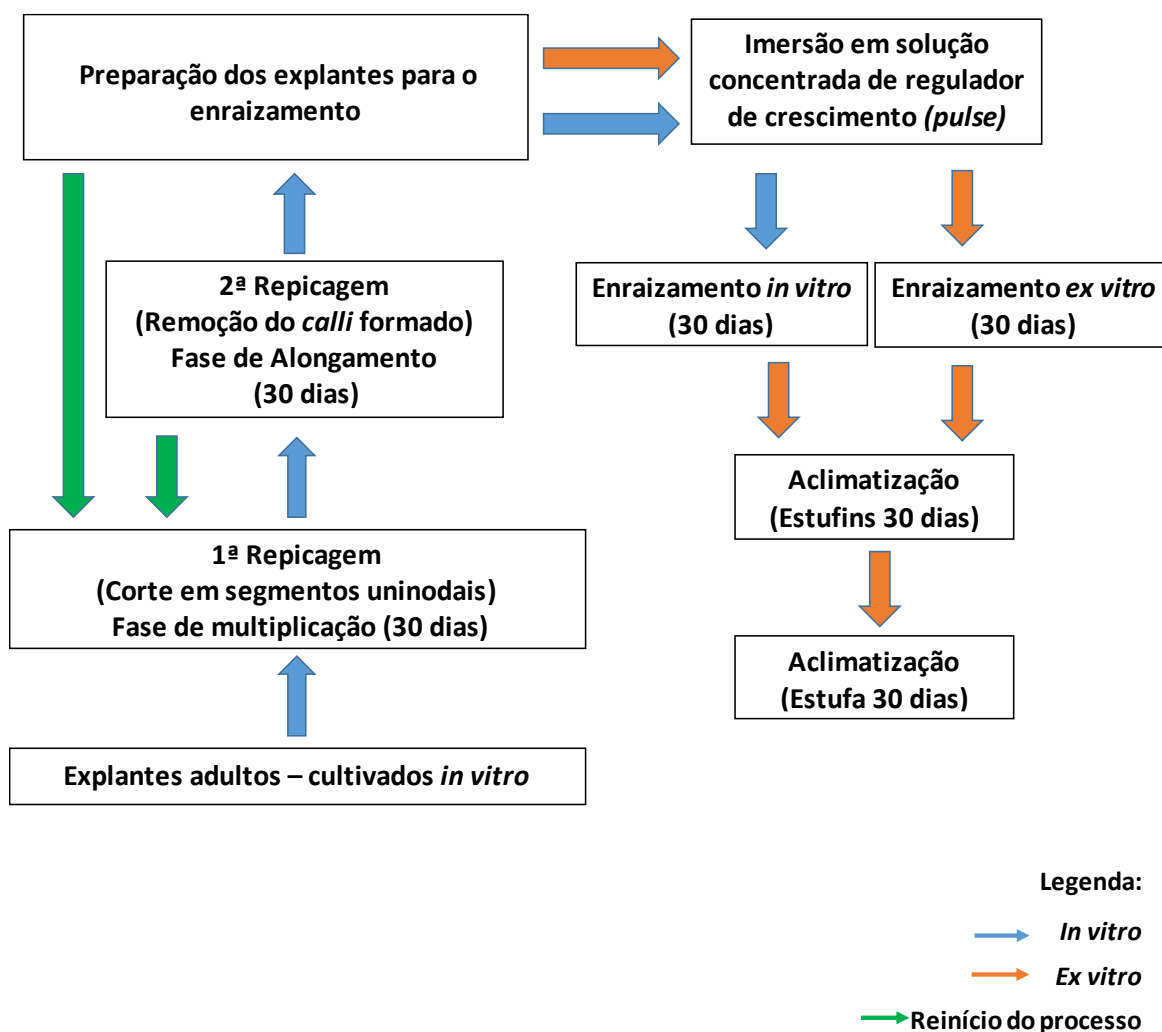


Figura 24: Fluxograma de produção *in vitro* de oliveiras, com enraizamento *in vitro* (→) e com enraizamento *ex vitro* (→).

O meio de cultura apresenta um ambiente mais propício ao desenvolvimento de agentes contaminantes como fungos ou bactérias, quando comparado com os substratos orgânicos utilizados no enraizamento *ex vitro*, onde naturalmente ocorre

numa vasta proliferação microbiana, que, quando em equilíbrio, de alguma forma inibe o desenvolvimento isolado de agentes patogénicos nefastos para a planta, como acontece com um meio estéril que se deixa contaminar por um determinado fungo ou bactéria.

Acresce ainda que a indução do enraizamento recorrendo à técnica de '*pulse*', no caso de ser realizado *in vitro*, exige que o manuseamento dos explantes seja feito individualmente e com materiais esterilizados. Já no caso da mesma técnica ser utilizada para o enraizamento *ex vitro*, todos os explantes a colocar numa caixa podem ser agrupados à mão, realizando-se o '*pulse*' para todo grupo em simultâneo. Este facto para além de tornar o processo mais simples, permite uma diminuição do tempo em que os explantes se encontram fora dos recipientes de cultura ou de enraizamento, reduzindo a sua desidratação.

Pelo que acabamos de referir, confirma-se pela aplicação desta metodologia uma simplificação de processos, tanto na fase de indução dos explantes, como nas fases seguintes, ao mesmo tempo que facilita o transplante das plantas enraizadas para a fase de aclimatização, à que este é realizado com raiz protegida.

7. Referências Bibliográficas

Altamura, M. (1996). Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured in vitro. A critical review. *Agronomie* 16, 589 – 602.

Augé, R., Beauchesne, G., Gibod-Boccon, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Monrand, J., Reynoird, J., Strullu, D. & Vidalie, H. (1989). *La culture in vitro et ses applications horticoles*. J.B.Baillière (eds), 57-62.

Avidan, B. & Lavee, S. (1978). Physiological aspects of the rooting ability of olive cultivars. *Acta Horticulturae*, 79, 93 – 102.

Ayoub, S.J. & Qrunfleh, M.M. (2006). Anatomical aspects of rooting Nabali and Raseei olive semi-hardwood stem cuttings. *Jordan J. Agric. Sci.*, 2, 16 – 27.

Ayoub, S.J. & Qrunfleh, M.M. (2008). A study on some physiological and anatomical aspects of rooting ‘Nabali’ and ‘Raseei’ olive semi-hardwood stem cuttings. *Acta Horticulturae*, 773, 221–226.

Bakr, E., Selim, H., Nour, G. & Gabr, M. (1977). Developmental anatomy of adventitious roots on stem cuttings of Wetaken olive cultivar. *Egyptian Journal of Horticulture*, 4, 91 – 97.

Barranco, D., Fernandez-Escobar, R. & Rallo, L. (1999). *El Cultivo Del Olivo*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Berthon, J.Y., Ben Tahar, S., Gaspar, T. & Boyer, N. (1990). Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum* in vitro and their requirements. *Plant Physiology Biochemistry*, 28, 631 – 638.

Bohm, J., Peixe, A. & Palhete J., (1998). *Dificuldades com o enraizamento por estacaria semi-lenhosa de variedades de oliveiras, necessárias às zonas demarcadas para produção de Azeite de qualidade*. In I Simpósio Nacional de Olivicultura - *Revista de Ciências Agrárias* 1,2,3 e 4 (XXI) 71 – 75.

Brahadda, N., Abousalim, A. & Walali Loudiyi, D.E. (2003). Eff et du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Marocaine. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 7, 177-182.

Bucklin, R. A., Henley, R. W. & McConnell, D.B. (1993). *Fan and Pad Greenhouse Evaporative Cooling Systems*. Florida: University of Florida.

Caballero, J. & Nahlawi, N. (1979). Influence of carbohydrates and washing with water on the rooting of the Gordal cultivar of the olive (*Olea europaea* L.). *Anales Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie Producción Vegetal*, 11, 219 – 230. Madrid.

Carlos, R. (2014). *Multiplicação in vitro de Cultivares e Porta-Enxertos de Nogueira (Juglans regia L.); Estudo das Fases de Enraizamento e Climatização*. Mestrado em Engenharia Agronómica, Universidade de Évora, Évora.

Chaari-Rkhis, A., Maalej M., Drira, N. & Standardi, A. (2010). *Micropropagation of olive tree Olea europaea* L. 'Oueslati'. Italy.

Ciampi, C. & Gellini, R. (1963). The origin and development of adventitious roots in *Olea europaea*: the importance of anatomical structure in rootlet development. *G. Bot. Ital.*, 70, 62 – 74.

Cordeiro, A.M., Calado, M.L., Morais, N., Miranda, A. & Carvalho, M.T. (2010). Variedades de oliveira – 'Galega Vulgar'. *Vida Rural*.

DRADR (2010). *Proteção integrada do olival*. 2ª Edição. Lisboa.

Enoque, E. (2014). *Avaliação de Consumos Energéticos em Diferentes Sistemas de Produção em Olivicultura*. Mestrado em Engenharia Agronómica, Universidade de Évora, Évora.

Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M., & Kailis, S. (2004). *Olive Propagation Manual*. CSIRO, Australia.

Fernández, J. (2013). Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Elsevier B.V.*

Fiorino, P. & Leva, A.R. (1986). Investigation on the micropropagation of the olive (*Olea europaea* L.): influence of some mineral elements on the proliferation. *Olea*, 17, 101-104.

Fontanazza, G. & Rugini, E. (1977). Effect of leaves and buds removal on rooting ability of olive tree cuttings. *Olea*, 9 – 28.

Fouad, M., Fayek, M., Selim, H. & El-Sayed, M. (1990). Rooting of eight olive cultivars under mist. *Acta Horticulturae*, 286, 57 – 60.

Francisco Tapia C., Mario Astorga P., Antonio Ibacache G., Leoncio Martínez B., Carlos Sierra B., Carlos Quiroz E., Patricia Larraín S. & Fernando Riveros B. (2003). *Manual del cultivo del olivo*. Chile: Prograf Impresores Ltda.

Garcia, A. G. (1997). *Nueva Olivicultura*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Gouveia, C., Peres, M.F., Vitorino, M.C., Henriques, L.R. & Pinheiro-Alves, M.C. (2003). *Polifenóis e tocoferóis em azeites monovarietais*. Actas do III Simpósio Nacional de Olivicultura.

Gouveia, J.M. (2007). O Azeite da 'Galega Vulgar', Património Nacional. Relatório final do projecto Agro 683 - "*Desenvolvimento integrado de estratégias para a reabilitação da cv. 'Galega vulgar', como cultivar de charneira no património oleícola nacional.*"

Guia azeites de Portugal (2012). Lisboa: Enigma editores.

Hartmann, H., Kester, D. & Davies, F. (1990). *Plant Propagation. Principles and Practices, 5th edition*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.

Heloir, M.C., Kevers, C., Hausman, J.F. & Gaspar, T. (1996). Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of in-vitro-propagated walnut shoots. *Tree Physiology*, 16, 515 – 519.

Ismaili, H. & Lani, V. (2013). The study of rhizogenesis in the vegetative sprig of the olive (*Olea europaea* L.) through the method of mist propagation. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*. University of Tirana.

Jacob, A., Cordeiro T., Vaz, A., Nascimento, M., Bernardino, S., Fação, R., Aranha, T., Ferreira, B. & Sousa, J. (2013). *In vitro clonal behavior of Olea Europaea L., variety 'Galega Vulgar'*. Instituto politécnico de Santarém, Santarém.

Jacoboni, N., Battaglini, M. & Preziosi, P. (1977). Manuele d'Oleiculture. *FAO*: 31-70.

Krisantini, S., Johnston, M., Williams, R. R. & Beveridge, C. (2006). Adventitious root formation in *Grevillea* (*Proteaceae*), an Australian native species. *Scientia Horticulturae*, 107, 171 – 175.

Lamb, J. G. D., Kelly, J. C. & Bowbrick, P. (1975). *Nursery Stock Manual*. London: Grower Books.

Leitão, F. A. (1982). A Propagação da oliveira. *Olivicultura*, 4. Direcção-Geral De Agricultura.

Leva, A. (2011). Innovative protocol for “ex vitro rooting” on olive micropropagation. *Central European Journal of Biology*, 6 (3), 352-358.

Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. & Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 17, 1090 – 1104.

Lopes, J. I. & Pinto, J. F. S. (2010). *Enxertia da oliveira*. Núcleo de documentação e relações públicas, D.R.A.P. Norte.

Macedo, E., Vieira, C., Carrizo, D., Porfirio, S., Hegewald, H., Arnholdt-Schmitt, B., Calado, M. & Peixe, A. (2013). Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots: anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88, 53– 59.

Macedo, ES. (2005). ‘Studies on the potential of alternative oxidase (AOX) as a functional marker candidate for efficient adventitious rooting in olive (*Olea europaea* L.). Universidade de Évora, Évora.

Mahlstede, J. P., Haber, E. S. (1957). *Plant Propagation*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Mencuccini, M. (1995). Micropropagazione e miglioramento genético in vitro dell’olivo: stato dell’arte e prospettive future. *Rivista di Frutticoltura*, 12, 73-82.

Mencuccini, M. (2003). Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Instituto di Rcerche sulla Olivicoltura. *Scientia Horticulturae*, 97, 129-139, Italy.

Morato, J., Cruz, S., Pereira, F. & Metrôlho, J. C. (s.d.). *Multi-Monitorização de Estufa Agrícola*. Castelo Branco: Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Navelo, D. B., Cimato, A., Fiorino, P., Romero, L. R., Touzani, A. Castañeda, C., Serafini, F. & Navas, I. T. (2000). Catálogo Mundial De Variedades De Olivo, Ed. Concelho Oleícola Internacional (pp. 360).

Oliveira, A., Pasqual, M., Chalfun, N., Regina, M., & Rincón, C. (2003). Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. *Ciências e Tecnologia*, 27, (1) 117-125.

Pacurar, D.I., Perrone, I. & Bellini, C., (2014). Auxin is a central player in the hormonecross-talks that control adventitious rooting. *Journal of Plant Physiology*, 151, 83 – 96.

Payghamzadeh, K. & Kazemitabar, SK. (2011). *In vitro* Propagation of Walnut. *African Journal of Biotechnology*, 10 (3), 290-311.

Peer, W.A. & Murphy, A.S. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Science*, 12, 556 – 563.

Peer, W.A., Blakeslee, J.J., Yang, H. & Murphy, A.S., (2011). Seven things we think weknow about auxin transport. *Molecular Plant*, 4, 487 – 504.

Peixe, A., Calado, M., & Porfírio, S. (2003). Propagação da oliveira – Metodologias e sua evolução. In J. Böhm (Eds.), *O Grande Livro da Oliveira e Do Azeite – Portugal Oleícola*, (101 – 119). DinaLivro editora, Lisboa.

Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H. & Macedo, E. (2007b). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Sci Hortic.*, 113, (1), 1 – 7.

Peixe, A., Serras, M., Campos, C., Zavattieri, M. & Dias, M.A., (2007a). Estudo histológico sobre a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de oliveira (*Olea europaea* L.). *Revista de Ciências Agrárias* 30, 476 – 482.

Peres, F., Ramos, A., Vitorino, C., Gouveia, C., Ferreira-Dias, S. & Martins, L. L. (2012). Avaliação da maturação em azeitona ‘Cobrançosa’ e ‘Galega Vulgar’ com recurso a diferentes metodologias baseadas na cor dos frutos. *Atas Portuguesas de Horticultura*, 21, 369-374.

Peres, M.F., Henriques, L.R., Pinheiro-Alves, M.C. & Simões, P. (2002). Characterization of three monovariety olive Oils of Beira Baixa (Portugal). *Acta Horticult.*, 586, 641-643.

Petrucelli, R., Bati, C. B., Carlozzi, P., Padovani, G., Vignozzi, N. & Bartolini, G. (2015). Use of azzolla as a growing médium componente in the nursery production of olive trees. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, (4) 333-339.

Pimentel, A. dos Santo, (2010). *Capacidade de enraizamento de estacas semi-lenhosas de oliveira das variedades Cobrançosa, Verdeal, Negrinha e Santulhana*. Mestrado em Gestão de Recursos Florestais, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança.

Porfírio, S., Silva, M., Cabrita, M., Azadi, P., & Peixe, A. (2015). Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, 198, 207-226.

Preece, J.E. (2003). A century of progress with vegetative plant propagation. *HortScience*, 38 (5), 1015 – 1025.

Proubi, A. (1998). Factores que influyen en el enraizamiento y crianza de plantas de olivo. Tesis (Master of Science). Universidad de Córdoba, Córdoba.

Qrunfleh, M., Rushdi, Y., Musmar, T. & Rushdi, L. (1994). Root formation in cuttings of the Nabali olives with uniconazole and indolebutyric acid. *Dirasat: Agric. Sci.*, 21, 71 – 79.

Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: backgrounds and uses in plantproduction. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 845 – 872.

Rallo, L. & Del Rio, C. (1990). Effect of a CO₂ enriched enviroment on the rooting ability and carbohydrate level of olive cuttings. *Advances in Horticultural Science*, 2, (4), 129-130. New York.

Rama, P. & Pontikis, C.A. (1990). In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) “Kalamon.” *Journal of Horticulture Science*, 65, 347-353.

Rodrigues, M. A. & Correia, C. M. (2009). *Manual da safra e contra safra do olival*. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.

Rugini, E. & Fedeli, E. (1990). Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Legumes and Oilseed Crops I, Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 593 – 641.

Rugini, E. & Pannelli, G. (1993). Olive (*Olea europaea* L.) biotechnology for short termgenetic improvement. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, 4, 3 – 5.

Rugini, E. (1984). In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and médium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Sci Hortic.*, 24, 123–134.

Salama, M., Zahran, M. & Hassan, M. (1987). Comparing the rooting ability of some olive cultivars propagated by leafy cuttings under mist. *Annals of Agricultural Sciences, Egypt*.

Santos, F.D. & Miranda P. (2006). *Alterações Climáticas em Portugal. Cenários, Impactos e Medidas de Adaptação* - Projecto SIAM II. Gradiva, Lisboa.

Shahidian, S., Serralheiro, R.P., Teixeira, J.L., Serrano, J., Santos, F.L. & Guimarães, R.C. (2011). *Utilização da equação de Hargreaves Samani para o cálculo da ETo em estufas*. VI Congresso Ibérico de AgroIngeniería, Évora.

Silva, A. (2015). *Enxertias – Manual técnico para amadores e profissionais*. Publindústria: Edições Técnicas, Porto.

Silva, A. A. F. (2008). *Necessidades hídricas e resposta da oliveira (Olea europaea L.) ao deficit hídrico na região da terra quente*. Doutoramento em Engenharia Agrícola, Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila real.

Silva, D.F., Villa, F., Vieira Neto, J. & Medeiros, R.M.L. (s.d.). *Desempenho de substratos na capacidade de enraizamento de estacas de oliveira*. Minas Gerais: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

Therios, I. (2009). *Olive*. UK: Biddles Ltd, King's Lynn.

Villa, F., Pasqual, M., & Freitas, G. (2010). Otimização de um protocolo para micropropagação da oliveira Ascolano 315. *Revista Ceres*, 57 (4), 530-534.

Zolman, B.K., Yoder, A. & Bartel, B. (2000). Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics*, 156, 1323 – 1337.

Zuccherelli, G. & Zuccherelli, S. (2002). In vitro propagation of fifty olive cultivars. *Acta Horticult.* 586, 931-934.

